

**ВАЖНАЯ ИНФОРМАЦИЯ  
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ  
ПЦР**

**Real PCR**

- 1. ТЕХНИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО**
- 2. ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ**
- 3. НАБОР ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПИН-КОЛОНОК**
- 4. РУКОВОДСТВО ПО ОРГАНИЗАЦИИ И ДЕКОНТАМИНАЦИИ  
ЛАБОРАТОРИИ**
- 5. ЭКСТРАКЦИЯ РНК ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА А**
- 6. СМЕСЬ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА А**
- 7. ТЕСТ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ РНК ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА А**

# Техническое руководство по методу RealPCR\*

Test with Confidence™

**IDEXX**

## Оглавление

### Оглавление

|  |    |
|--|----|
| Полимеразная цепная реакция (ПЦР)                                    | 3  |
| Цикл синтеза ПЦР-ДНК   | 3  |
| ПЦР в режиме реального времени (кПЦР)                                | 4  |
| Форматы обнаружения при ПЦР в режиме реального времени               | 6  |
| Экстракция нуклеиновых кислот  | 7  |
| Модульная платформа RealPCR  | 8  |
| Стандартизированный протокол для ДНК и РНК                           | 8  |
| Рекомендации по ПЦР-анализаторам в режиме реального времени          | 8  |
| Методы экстракции образцов RealPCR                                   | 10 |
| Контроли RealPCR   | 11 |
| Набор для лабораторного мониторинга RealPCR*                         | 14 |
| Сертификаты анализа и листки-вкладыши                                | 15 |
| Требования к хранению компонентов                                    | 16 |
| Упаковка - маркировка компонентов и система цветов крышек            | 16 |
| Приготовление к анализу  | 17 |
| Анализ методом ПЦР в режиме реального времени и интерпретация данных | 17 |
| Часто задаваемые вопросы   | 18 |
| Модульная платформа RealPCR и компоненты                             | 18 |
| Экстракция   | 18 |
| ПЦР  | 19 |
| Требования к термоциклеру  | 21 |
| Определения  | 22 |

## Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Все живые организмы содержат ДНК или РНК в качестве генетического материала. На основе последовательности генетического материала можно идентифицировать определенные организмы и/или вирусы, присутствующие в образце. Количество ДНК обычно слишком мало, чтобы ее можно было обнаружить непосредственно в образце; ПЦР используется для амплификации ДНК до детектируемого уровня.

РНК-матрицу сначала преобразуют в комплементарную ДНК (кДНК), а затем проводят ПЦР. Этот процесс называется ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Для ПЦР необходимо несколько основных компонентов:

1. Основная реакционная смесь: ДНК-полимераза (фермент, способный синтезировать ДНК), свободные дНТФ (строительные блоки ДНК для новой цепи ДНК), буфер (содержащий  $MgCl_2$ ) и обратная транскриптаза (в случае РНК-мишеней)
2. Праймеры: Короткие синтетические олигонуклеотиды ДНК, которые иницируют удлинение и определяют область ДНК для амплификации
3. Положительный контроль: Содержит тестовую мишень и подтверждает, что ПЦР проведена
4. Отрицательный контроль (вода для ПЦР): Свидетельствует о контаминации при положительном результате

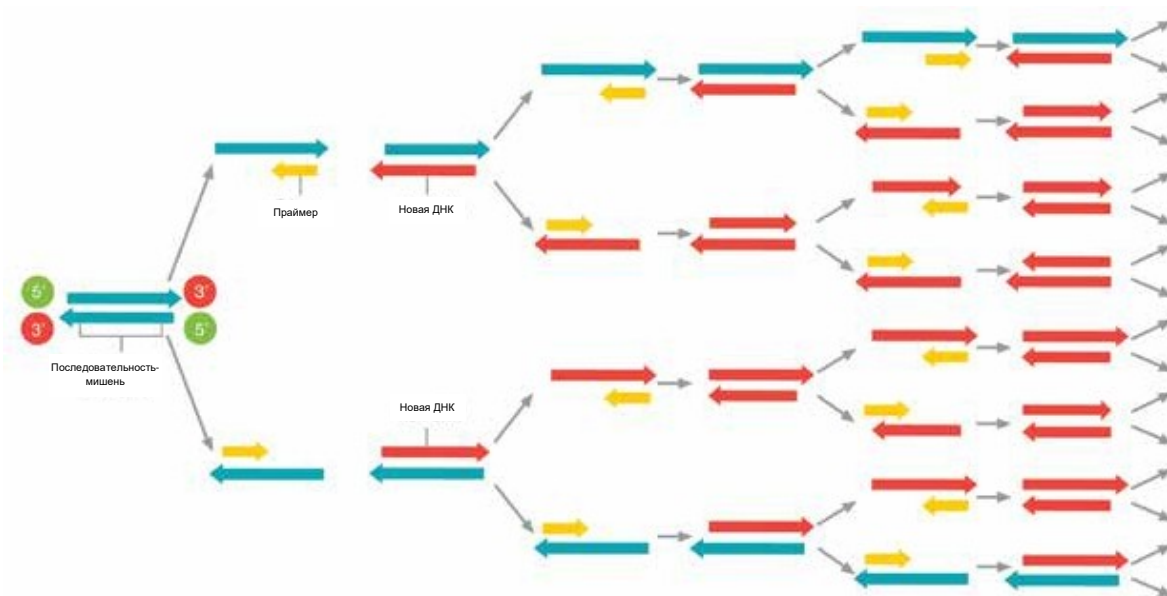
ПЦР является поэтапным процессом, который занимает 1-2 часа в зависимости от программы и ПЦР-анализатора:

1. Денатурация: Двухцепочечная ДНК в образце денатурируется при высокой температуре с образованием одноцепочечной ДНК.
2. Отжиг: Специфичные праймеры связываются с заранее определенными участками одноцепочечной ДНК.
3. Элонгация: ДНК-полимераза удлиняет праймеры, добавляя свободные дНТФ.

После ПЦР ДНК исходного образца (родительская ДНК) экспоненциально амплифицирована и может быть обнаружена (рисунок 1). В традиционной ПЦР обнаружение осуществляется с помощью гель-электрофореза и окрашивания ДНК. В ПЦР в режиме реального времени обнаружение происходит одновременно с амплификацией путем наблюдения за флуоресценцией после каждого цикла нагревания и охлаждения.

Рисунок 1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

## Цикл синтеза ПЦР-ДНК

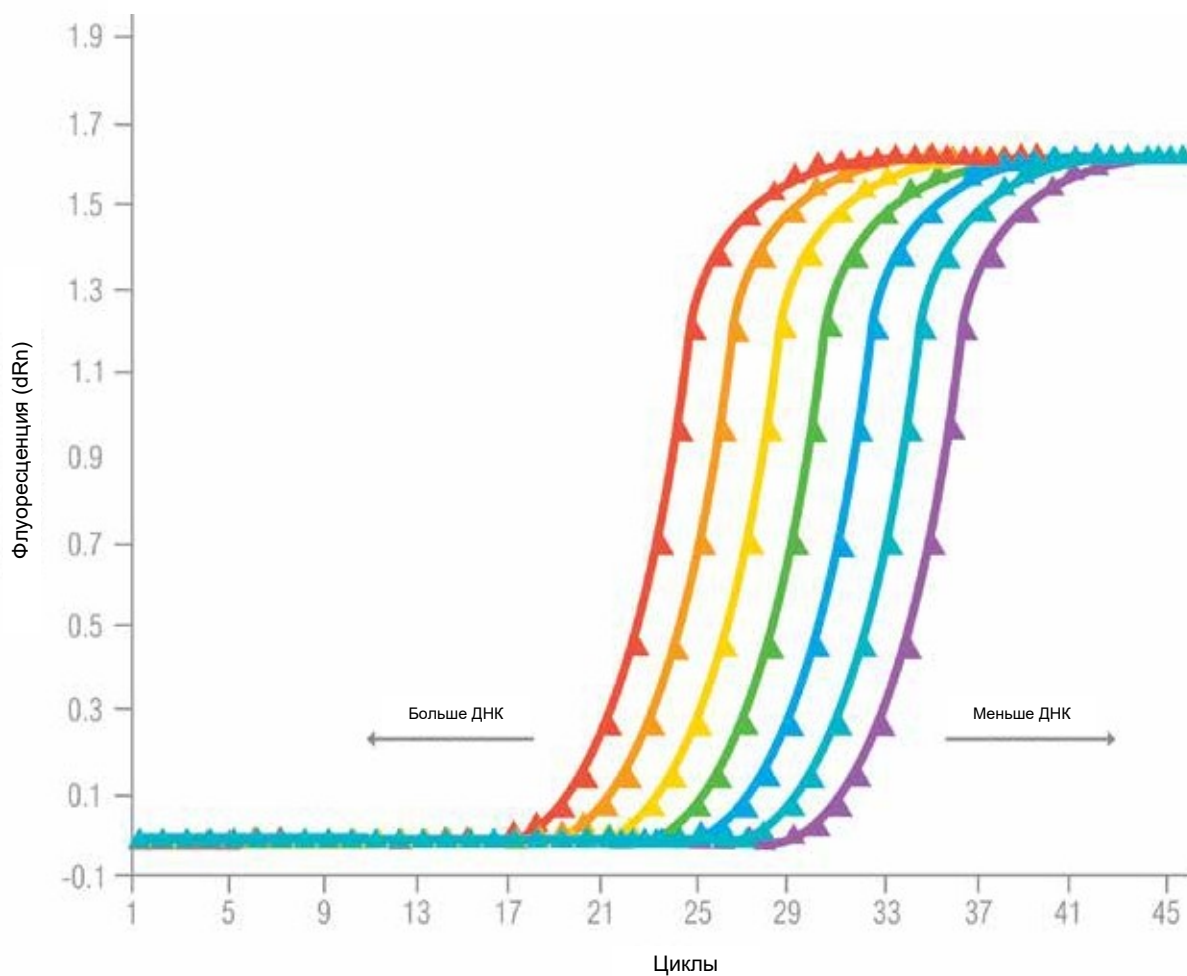


## ПЦР в режиме реального времени (кПЦР)

В ПЦР в режиме реального времени, также называемой количественной или кПЦР, для обнаружения целевой нуклеиновой кислоты в образце используются как праймеры, так и зонды. Зонды похожи на праймеры, но содержат прикрепленные флуоресцентные красители, используемые для обнаружения амплифицированной мишени. После каждого цикла кПЦР флуоресценцию наблюдают по кривой амплификации.

Рисунок 2. Кривая амплификации ПЦР в режиме реального времени

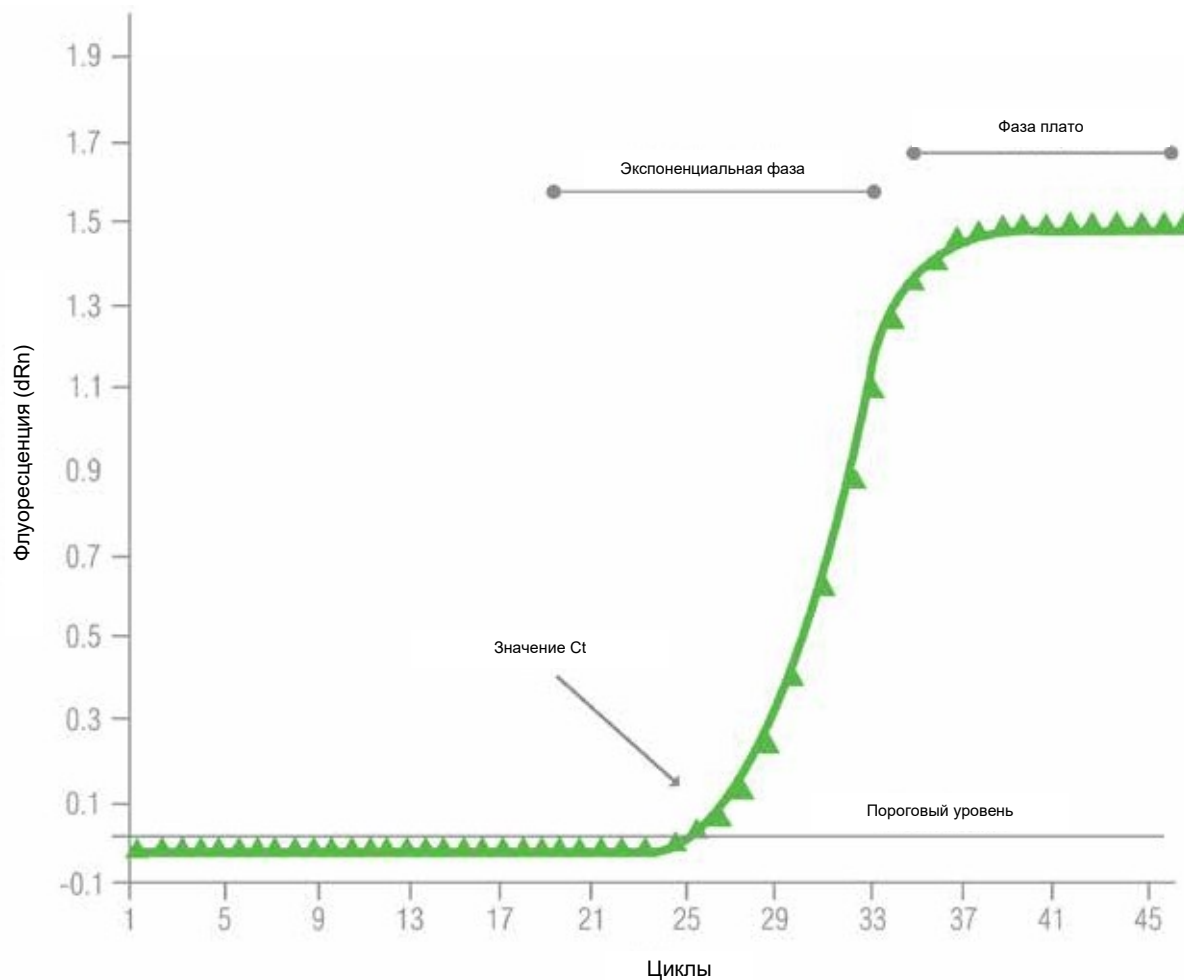
### Графики амплификации



Как правило, для обнаружения наименьшего количества нуклеиновой кислоты-мишени в образце необходимо 40–45 циклов ПЦР в режиме реального времени. Как показано на рисунке 3, цикл ПЦР, при котором флуоресценция достигает заданного порогового уровня, называется значением  $C_t$  (или значением  $C_q$  или  $C_p$ ). Чем больше нуклеиновой кислоты-мишени изначально присутствует в образце, тем раньше будет достигнуто значение  $C_t$ .

Рисунок 3. Характеристики кривой амплификации

## Графики амплификации



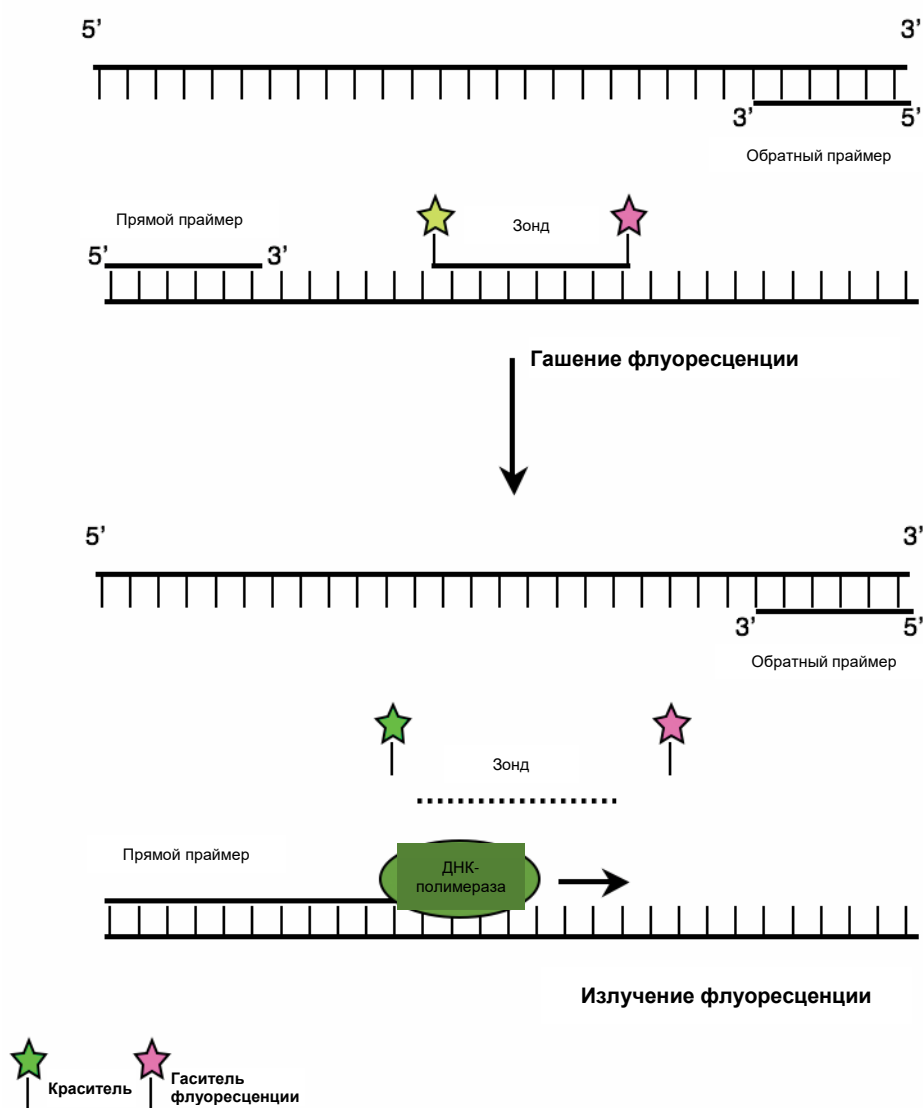
## Форматы обнаружения при ПЦР в режиме реального времени

Флуоресценция - это излучение света веществом, поглотившим свет. В ПЦР в режиме реального времени используются флуоресцентные красители, сигнализирующие о присутствии амплифицированной ДНК-матрицы. Таким образом, в анализаторе для ПЦР в режиме реального времени реакционная смесь подвергается воздействию света с определенной длиной волны (возбуждение), а в результате реакции излучается свет (излучение) с другой длиной волны. Канал обнаружения/фильтрации в анализаторе для ПЦР в режиме реального времени считывает определенную длину волны, блокируя другие. Все распространенные флуоресцентные красители, используемые в ПЦР в режиме реального времени, имеют специфические спектры возбуждения и излучения (например, максимум возбуждения FAM\* составляет 495 нм, а его максимум излучения - 520 нм). При использовании разных флуоресцентных красителей можно одновременно обнаруживать несколько мишеней в одной лунке для ПЦР (мультиплексная ПЦР).

Гидролизуемые зонды являются наиболее распространенной формой зондов для количественной ПЦР и широко используются в диагностике в медицине, ветеринарии и экологии. В этих зондах используется флуоресцентный краситель на одном конце олигонуклеотида ДНК и гаситель флуоресценции на другом (см. Рисунок 4). Во время ПЦР зонд специфически отщипывается с целевой последовательностью ДНК (из образца), которая фланкируется двумя праймерами.

По мере того как ДНК-полимераза удлиняет новую цепь ДНК, зонд разлагается экзонуклеазной активностью 5'-3' полимеразы, в результате чего флуорофор отделяется от гасителя и излучает флуоресценцию. Чем больше ДНК присутствует в реакции, тем раньше флуоресценция достигает детектируемого уровня, что приводит к более ранним значениям  $C_t$ .

Рисунок 4. Гидролизуемые зонды



## Экстракция нуклеиновых кислот

На ПЦР отрицательно влияет присутствие ингибиторов в образце; экстракция нуклеиновой кислоты требуется для очистки ДНК или РНК от других компонентов в образце. Ингибиторы ПЦР включают детергенты, хелаторы и нуклеазы, которые могут влиять на фермент(ы), содержащиеся в реакционной смеси. Экстрагированный образец содержит очищенную ДНК или РНК для интересующей мишени (при ее наличии), а также нуклеиновую кислоту хозяина. Метод экстракции является важным фактором для каждого типа образца и ПЦР в режиме реального времени.

### Методы очистки

**Колонки для связывания:** Колонки для связывания содержат мембраны из силикагеля, которые связывают нуклеиновые кислоты, пропуская при этом нежелательный материал. Этот фильтрат проходит под действием вакуума, центрифугирования или гравитации, в то время как РНК/ДНК прилипает к фильтру и элюируется отдельно.

**Магнитные частицы:** Магнитные частицы представляют собой материал из стекла или кремнезема, который связывает РНК и/или ДНК, присутствующие в образце. Нежелательный материал смывается, а нуклеиновые кислоты могут быть извлечены из гранул в чистый контейнер.

**Быстрые приготовления:** Быстрые приготовления включают кипячение и буферы для экспресс-лизиса, заменяющие протокол очистки. Для экспресс-лизиса образец добавляют к раствору, содержащему фермент, и нагревают до температуры около 65 °С в течение 30–60 минут. Последующая инкубация при температуре 97 °С в течение 10–15 минут инактивирует ферменты в растворе для экспресс-лизиса. Охлажденный раствор используется в качестве образца при ПЦР в режиме реального времени. Методы быстрого приготовления не используются повсеместно из-за потенциальных ингибиторов. Методы быстрого приготовления подходят только для определенных анализов и типов образцов.



## Модульная платформа RealPCR

Платформа RealPCR содержит смеси праймеров и зондов для конкретных мишеней для использования с общими стандартными мастер-миксами и один положительный контроль (рисунок 5). Помимо общих реактивов, платформа RealPCR также имеет стандартизированный протокол циклирования ПЦР для всех анализов на определение РНК и ДНК. Преимущества данной платформы - стандартизированные реактивы, единый протокол циклирования для всех смесей RealPCR и гибкое управление реактивами. Платформа RealPCR также совместима с инструментами лабораторного мониторинга RealPCR.

Рисунок 5. Платформа RealPCR

### Модульная платформа RealPCR



#### Стандартизированный протокол для ДНК и РНК

Независимо от того, проводится ли анализ на наличие РНК или ДНК, в платформе RealPCR используется единый протокол циклирования. Таким образом, можно проводить несколько анализов одновременно с использованием одного и того же ПЦР-анализатора.

Рекомендации по ПЦР-анализаторам в режиме реального времени

Анализы методом RealPCR были валидированы с применением следующих анализаторов для ПЦР в режиме реального времени:

- Applied Biosystems\* 7500
- Applied Biosystems\* QuantStudio\*
- Applied Biosystems\* ViiA\* 7
- Agilent AriaMx\*
- Agilent Mx3000P\*
- Agilent Mx3005P\*
- Roche LightCycler\* 480
- Bio-Rad CFX96\*
- QIAGEN\* Rotor-Gene\* (72-луночный ротор)

Анализы методом RealPCR можно проводить на других ПЦР-анализаторах, но должны быть валидированы.

Большинство программного обеспечения ПЦР-анализаторов в режиме реального времени имеет аналогичные рабочие процессы, включающие определение мишеней (например, вируса диареи КРС, *Mycoplasma gallisepticum*, вируса блютанга) и других параметров.

#### **Подготовка к проведению реакции**

- Форматы планшетов для ПЦР различаются в зависимости от анализатора, но могут включать 96-луночные планшеты, 8-луночные полоски (в 96-луночном держателе) или 384-луночные планшеты.
- Присвоить или определить следующие параметры: наименование образца, положения образца, протокол циклирования и каналы фильтрации.

#### **Анализ**

- В большинстве анализаторов предлагается несколько режимов анализа.
- Программное обеспечение анализатора рассчитывает исходное и пороговое значение, а также определяет значения Ct.
  - В программном обеспечении каждого анализатора используются разные алгоритмы для вычисления Ct.
  - На разных анализаторах можно получить разные значения Ct для одного и того же образца.
  - Можно получить разные значения Ct для одного и того же образца на одном и том же анализаторе, используя другой алгоритм анализа.
  - Хотя значения Ct могут различаться, положительный образец всегда должен иметь характерную кривую амплификации по сравнению с отрицательным ПЦР-контролем.
- Количество нуклеиновой кислоты-мишени может быть приблизительно определено на основе значения Ct.
  - Более раннее значение Ct = большее количество мишени
  - Более позднее значение Ct = меньшее количество мишени
- Визуальный осмотр кривых амплификации важен для подтверждения функциональности программного обеспечения анализатора.

#### **Экспорт**

- Большинство типов программного обеспечения анализаторов имеют возможность экспортировать данные для управления ими.

#### **Калибровка**

- Оптику и термические параметры анализатора следует калибровать в соответствии с рекомендациями его производителя. В некоторых регионах может потребоваться привлечение сторонней компании для проведения термической калибровки. При использовании анализатора для ПЦР в режиме реального времени Roche LC480 обратитесь в службу технической поддержки IDEXX для получения инструкций по созданию файла цветовой компенсации, часто необходимого для мультиплексных анализов.

#### **Пассивный референсный краситель ROX\* и нормализация ROX**

ROX требуется для некоторых анализаторов для ПЦР в режиме реального времени (например, Applied Biosystems) или рассматривается как дополнительный для других анализаторов (например, Agilent). Пассивный референсный краситель ROX используется для нормализации флуоресцентных сигналов. Нормализация ROX используется программным обеспечением для устранения флуоресценции, не связанной с амплификацией, такой как пузырьки воздуха или разница в объеме между лунками. Кроме того, ROX помогает преодолевать эффекты периметра, при которых камерам анализатора трудно считывать флуоресценцию, возникающую по периметру 96-луночного планшета. Мастер-миксы RealPCR содержат референсный краситель ROX.

## Методы экстракции образцов RealPCR

Подробная информация о методах экстракции образцов, валидированных для каждой смеси RealPCR, содержится на вкладышах для соответствующих детекционных смесей RealPCR, специфичных для данной мишени. Валидированные методы обычно включают колоночную процедуру и метод магнитных частиц для больших анализируемых объемов. Некоторые смеси также имеют валидированный метод быстрого приготовления. В таблице 1 перечислены коды продуктов и версии вкладышей для коммерческих методов экстракции, упомянутых во вкладышах к продуктам RealPCR.

Таблица 1. Коммерческие методы экстрагирования

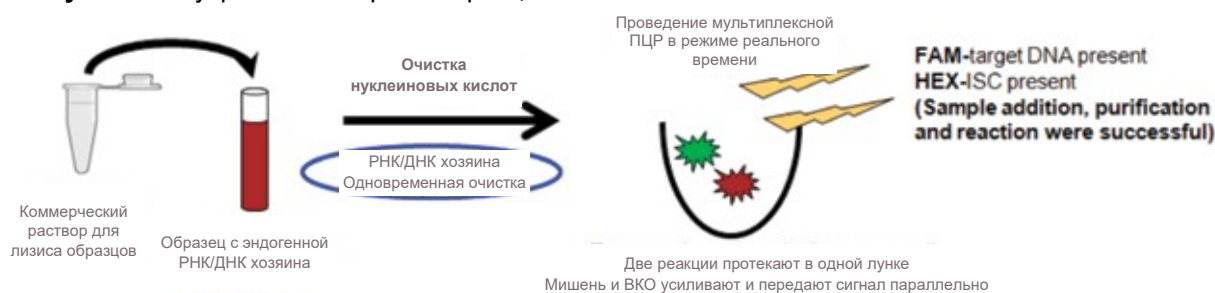
| Набор для экстракции  | Компания          | Номер по каталогу                          | Версия вкладыша к продукту   |
|---|-------------------|--|------------------------------|
| Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR* с применением магнитных частиц        | IDEXX             | 99-56102 (n = 384)<br>99-56106 (n = 96)    | 06-56102-00                  |
| Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR* с применением спин-колонок            | IDEXX             | 99-56103 (n = 50)                          | 06-56103-00                  |
| Буфер для экспресс-лизиса RealPCR*  | IDEXX             | 99-56370 (n = 100)                         | 06-56370-02                  |
| Мини-набор RNeasy*  | QIAGEN            | 74104 (n = 50)<br>74106 (n = 250)          | Июнь 2012 г.                 |
| Мини-набор для экстракции вирусной РНК QIAamp®                                      | QIAGEN            | 52904 (n = 50)<br>52906 (n = 250)          | Декабрь 2014 г.              |
| Мини-набор для экстракции ДНК QIAamp*   | QIAGEN            | 51304 (n = 50)<br>51306 (n = 250)          | Май 2016 г.                  |
| Набор для выделения вирусной ДНК MagMAX*-96   | Life Technologies | AM1836 (n = 96)<br>AMB18365 (n = 5 x 96)   | 1836М версия Н               |
| Набор для обнаружения РНК/ДНК патогенов MagMAX*                                     | Life Technologies | 4462359 (n = 480)                          | 4463379 Ред. В               |
| Набор для выделения общих нуклеиновых кислот MagMAX*                                | Life Technologies | AM1840 (n = 100)                           | 4385118 Версия С             |
| Набор для экстракции вирусной ДНК/РНК с применением магнитных частиц NucleoMag* VET | Macherey-Nagel    | 744200.1 (n = 96)<br>744200.4 (n = 4x96)   | Январь 2017/ версия 05       |
| NucleoSpin* Virus   | Macherey-Nagel    | 740983.50 (n = 50)<br>740983.250 (n = 250) | Февраль 2015/ версия 02      |
| NukEx Pure RNA/DNA  | Gerbion*          | G05004-50 (n = 50)<br>G05004 (n = 200)     | Версия 3.1/2 ноября 2015 г.  |
| Набор для ПЦП High Pure PCR Template Prep   | Roche             | 11796828001 (n = 100)                      | Версия от 20 октября 2012 г. |

### Внутренний контроль образца (ВКО)

Основным подходом к внутреннему контролю, используемым в модульной платформе RealPCR, является ВКО. Дизайн внутреннего контроля ВКО нацелен на эндогенную РНК или ДНК из образца-хозяина. Мишень ВКО варьируется в зависимости от типа образца, вида хозяина и дизайна теста для патогена-мишени. Например, при помощи смеси RealPCR\* РНК ВД КРС можно определить присутствие коровьей РНК (ВКО), а также присутствие ВД КРС в образце. Таким образом, при использовании большинства смесей RealPCR нет необходимости добавлять внутренний положительный контроль (ВПК) к экстракту образца.

Для зонда ВКО используется другой флуорофор, так что реакция патогена-мишени и реакции ВКО протекают одновременно в одной лунке (рисунок 6). Положительный сигнал ВКО подтверждает метод получения образцов, добавление образца в реакцию ПЦР и качество образца. Кроме того, обнаружение ВКО валидирует этапы очистки нуклеиновой кислоты, обратной транскрипции и амплификации.

**Рисунок 6.** Внутренний контроль образца



Праймеры и зонд ВКО нацелены на эндогенный генетический материал хозяина. Большинство типов образцов будут содержать ВКО-мишень хозяина и тест будет положительным. В некоторых случаях резкоположительный образец может подавить реакцию ВКО, что приведет к слабому сигналу ВКО или его отсутствию. Это действительный результат теста, поскольку наличие мишени подтверждает надлежащее добавление образца, экстракцию и ПЦР. У некоторых типов образцов отсутствует мишень ВКО (например, пробы окружающей среды); поэтому рекомендуется применение ВПК RealPCR.

### Внутренний положительный контроль (ВПК) RealPCR\*

В некоторых смесях RealPCR используется ВПК в качестве внутреннего контроля. В этом случае ВПК RealPCR добавляется к раствору для экстракции и лизиса, а затем очищается вместе с образцом. ВПК RealPCR - это пул всех мишеней внутреннего контроля RealPCR, включая эндогенные ВКО-мишени хозяина. Следовательно, ВПК RealPCR может использоваться в дополнение к обнаружению ВКО для детекционных смесей RealPCR, в которых используется внутренний контроль ВКО.

### Положительный контроль (ПК) RealPCR\*

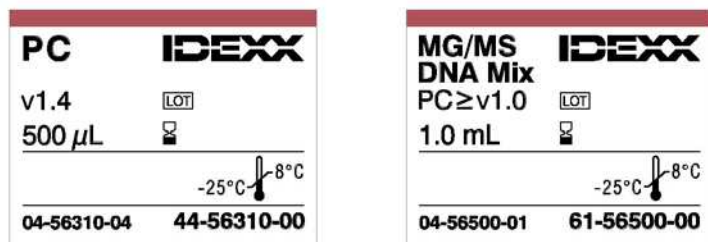
ПК представляет собой один флакон, содержащий все мишени RealPCR и ВКО, который может использоваться с любой детекционной смесью RealPCR. Он проверяет амплификацию нуклеиновой кислоты-мишени, тем самым подтверждая правильность работы детекционной смеси и мастер-микса. Кроме того, ПК содержит сигнатурную последовательность IDEXX, которую можно использовать для отслеживания потенциальной лабораторной контаминации ПК (см. подробные сведения ниже).

ПК и ВПК представляют собой высушенные компоненты, которые хранят при температуре от -25 °C до 8 °C и восстанавливают водой для ПЦР перед использованием. ПК и ВПК следует разделить на аликвоты во избежание повторного замораживания/оттаивания и хранить при температуре ниже -15 °C.

## Контроль версий ПК и ВПК RealPCR

ПК и ВПК RealPCR имеют номера версий (например, в. 1.0). Когда для линейки продуктов RealPCR разрабатываются новые детекционные смеси, к ПК добавляются последовательности-мишени, и номер версии ПК увеличивается (например, с версии 1.2 увеличивается до версии 1.3). Аналогичным образом обновляются версии ВПК, когда в ВПК добавляются новые мишени внутреннего контроля. На складе IDEXX может быть несколько контрольных версий. Устаревшие контрольные версии удаляются при запуске новой детекционной смеси RealPCR. Когда лаборатория начинает использовать детекционную смесь RealPCR, важно подтвердить версии ПК и ВПК.

Рисунок 7. Пример идентификации версии положительного контроля RealPCR



В таблицах 2 и 3 представлены наиболее часто используемые контрольные реактивы для ПЦР в режиме реального времени.

Таблица 2. Контрольные реактивы RealPCR

| Контроль качества                                       | Вид контроля   | Контролируемый процесс  | Рекомендуемая периодичность   |
|---|----------------|---|---|
| Положительный контроль (ПК)                             | Функциональный | кПЦР: праймеры, зонды и мастер-микс                               | Минимум один раз для каждой детекционной смеси  |
| Отрицательный контроль мишени (ОК) - вода               | Контаминация   | Контаминация реагентов для кПЦР, контаминация вследствие переноса | Минимум один раз для каждой детекционной смеси  |
| Внутренний контроль образца (ВКО) - ДНК или РНК хозяина | Функциональный | Добавление образца, целостность образца, экстракция и кПЦР        | Часть детекционной смеси (включая праймеры и зонды)                                     |
| Внутренний положительный контроль - ДНК и РНК (ВПК)     | Функциональный | Экстракция и кПЦР   | Требуется для некоторых анализов; не обязателен для анализа, в котором используется ВКО |

Таблица 3. Предлагаемые виды лабораторного контроля

| Контроль качества   | Вид контроля   | Контролируемый процесс                               | Рекомендуемая периодичность                     |
|---|--|--|---|
| Отрицательный контроль экстракции - вода                  | Контаминация   | Контаминация, возникающая при экстракции             | Один раз на каждые 20 экстрагированных образцов |
| Смесь ДНК для проверки сигналов RealPCR*                  | Положительный контроль для лабораторного мониторинга | Контаминация лабораторной среды                      | Один раз в неделю или в месяц                   |
| Смесь RealPCR* PC Tracker DNA                             | Контаминация   | Обнаруживает контаминацию ПК в лабораторных условиях | Один раз в неделю или в месяц                   |
| Мониторинг лабораторной контаминации - детекционные смеси | Контаминация   | Обнаруживает контаминацию в лабораторных условиях    | Один раз в неделю или в месяц                   |

## Набор для лабораторного мониторинга RealPCR\*

### Смесь RealPCR PC Tracker DNA

Смесь RealPCR PC Tracker DNA содержит праймеры и зонд, которые амплифицируют и обнаруживают сигнатурную последовательность IDEXX (уникальную последовательность, не встречающуюся в природе), включенную во все положительные контроли IDEXX RealPCR. Смесь RealPCR PC Tracker DNA предназначена для обнаружения перекрестной контаминации, вызванной ненадлежащим использованием материала положительного контроля. В рамках рутинного лабораторного мониторинга контаминации смесь трекеров может использоваться для определения наличия контаминации, происходящей от положительного контроля RealPCR. Дополнительную информацию см. во вкладыше к набору для лабораторного мониторинга RealPCR.

### Смесь ДНК для проверки сигналов RealPCR

Смесь ДНК для проверки сигналов RealPCR содержит праймеры и зонд, которые амплифицируют и обнаруживают консервативную последовательность бактериальной ДНК. Смесь ДНК для проверки сигналов RealPCR дает положительный результат теста с водой из-за характерного присутствия бактериальной ДНК и, следовательно, может использоваться в качестве положительного ПЦР-контроля во время рутинного лабораторного мониторинга контаминации. Дополнительную информацию см. во вкладыше к набору для лабораторного мониторинга RealPCR.

### Процедура мониторинга лабораторной контаминации

Мониторинг лабораторной контаминации - это процедура на основе мазка для обнаружения присутствия контаминации нуклеиновыми кислотами на лабораторных поверхностях, оборудовании или в окружающей среде.

Рекомендуется, чтобы частота мониторинга лабораторной контаминации (еженедельно или ежемесячно) была пропорциональна объему выполняемых ПЦР-тестов.

Образцы для лабораторного мониторинга следует анализировать со всеми детекционными смесями, используемыми в диагностической лаборатории, выполняющей ПЦР в режиме реального времени. Чтобы свести к минимуму риск контаминации во время лабораторного мониторинга, положительный образец-мишень не включается. Смесь ДНК для проверки сигналов RealPCR используется в качестве положительного контроля.

### Порядок взятия мазков из рабочей зоны

1. Используйте один ватный тампон для каждого рабочего места, которое нужно проверить на контаминацию.
2. Кратковременно окуните каждый тампон в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую примерно 300 мкл воды для ПЦР. Удалите излишки воды с тампона, прижав его кончик к стенке пробирки. Проведите тампоном примерно по 30 см рабочей поверхности 2–3 раза, вращая его.
3. Поместите кончик обратно в пробирку и энергично поворачивайте в течение 10–15 секунд, чтобы экстрагировать захваченную нуклеиновую кислоту на тампоне.
4. Удалите воду из тампона, прижав кончик к стенке пробирки; выбросьте тампон и используйте оставшуюся жидкость в качестве образца для каждой анализируемой детекционной смеси RealPCR.

**Пример:** Шаблон для мониторинга лабораторной контаминации

|                                      |                              | Детекционная смесь RealPCR |                     |                     |                     |                     |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                      |                              | A                          | B                   | C                   | D                   | E                   |
|                                      |                              | (Тест А)                   | (Тест В)            | (Тест С)            | (Тест D)            | (Тест Е)            |
| Образец: Экстракт мазка/Безматричный | Экстракция (Область 1)       | Область 1<br>Тест А        | Область 1<br>Тест В | Область 1<br>Тест С | Область 1<br>Тест D | Область 1<br>Тест Е |
|                                      | Смесь для ПЦР (Область 2)    | Область 2<br>Тест А        | Область 2<br>Тест В | Область 2<br>Тест С | Область 2<br>Тест D | Область 2<br>Тест Е |
|                                      | Образец/контроли (Область 3) | Область 3<br>Тест А        | Область 3<br>Тест В | Область 3<br>Тест С | Область 3<br>Тест D | Область 3<br>Тест Е |
|                                      | кПЦР-анализатор (Область 4)  | Область 4<br>Тест А        | Область 4<br>Тест В | Область 4<br>Тест С | Область 4<br>Тест D | Область 4<br>Тест Е |
|                                      | Вода (Безматричный контроль) | Область 5<br>Тест А        | Область 5<br>Тест В | Область 5<br>Тест С | Область 5<br>Тест D | Область 5<br>Тест Е |



## Процедура деконтаминации

Деконтаминация лабораторного пространства рекомендуется после обнаружения контаминации нуклеиновыми кислотами, которая привела к положительному значению Ct для мишени, проанализированной в рамках процедуры лабораторного мониторинга. Процедура деконтаминации и повторного анализа:

1. Для каждого участка лаборатории с положительным результатом используйте соответствующий реактив для деконтаминации, такой как 10% раствор хлорной извести (~0,5%-ный раствор гипохлорита натрия), DNA AWAY\*, DNAzap\* или аналогичный, для фрагментации контаминирующей нуклеиновой кислоты. Распылите достаточно жидкости, чтобы смочить всю поверхность.
2. Оставьте раствор минимум на 5 минут.
3. Очистите контаминированную область, вытерев ее бумажными полотенцами и дважды промыв деионизированной водой.
4. Важное замечание: Гипохлорит натрия может вступать в реакцию при контакте с некоторыми компонентами наборов для экстракции нуклеиновых кислот. Важно тщательно промыть поверхности.
5. Проведите повторный анализ деконтаминированного участка(ов) в соответствии с процедурой лабораторного мониторинга; используйте детекционные смеси, давшие положительный результат в первом подходе мониторинга лабораторной контаминации. Включите смесь ДНК для проверки сигналов RealPCR в качестве контроля для подтверждения положительной реакции ПЦР.
6. Запишите результаты в трекинг-файл программы мониторинга лабораторной контаминации.
7. Если результат анализа участка на наличие патогена продолжает оставаться положительным, повторите процедуру деконтаминации и выполните повторный анализ.

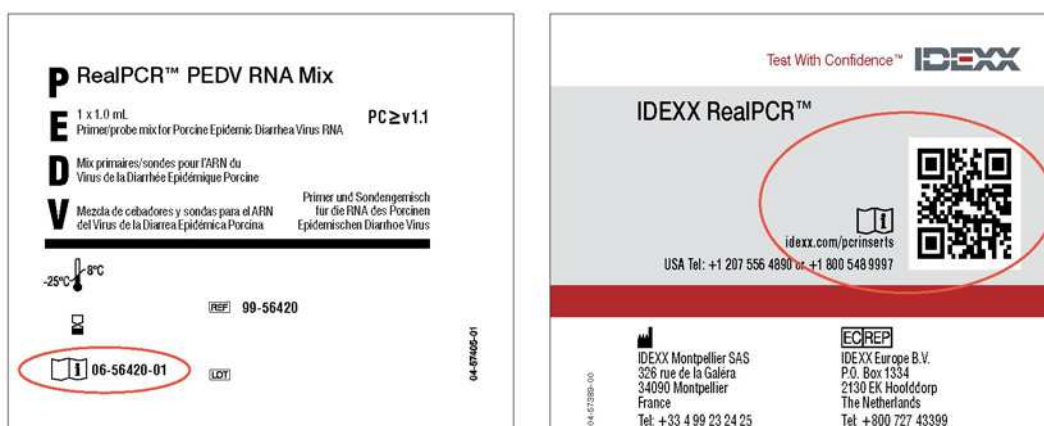
† Гипохлорит натрия со временем быстро разлагается. Для обеспечения максимальной эффективности каждые 2–4 недели готовьте новый раствор для деконтаминации, используя дистиллированную или деионизированную воду.

## Сертификаты анализа и листки-вкладыши

Листки-вкладыши доступны онлайн для каждой отдельной детекционной смеси RealPCR на сайте [idexx.com/PCRinserts](http://idexx.com/PCRinserts).

На внешней упаковке всех продуктов RealPCR имеется адрес на веб-сайта, на котором содержатся электронные версии вкладышей для продуктов. Это позволяет повысить контроль версий и видимость изменений, а также сократить количество отходов. Номер вкладыша для каждой детекционной смеси указан рядом с символом *i* на этикетке внешнего пакета. Посетите веб-сайт IDEXX ([idexx.com](http://idexx.com)), чтобы получить сертификат анализа для любой партии реактивов RealPCR.

Рисунок 8. Где найти вкладыши для продуктов RealPCR





## Требования к хранению компонентов

Таблица 4. Детекционные смеси RealPCR и их хранение

| Название  | Цвет крышки | Количество | Хранение после получения | Хранение после восстановления | Циклы замораживания/оттаивания |
|---|-------------|------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Детекционные смеси ДНК RealPCR (DNA TMx), сухие | Зеленый     | 1 x 1 мл   | от -25 °С до 8 °С        | от -25 °С до -15 °С           | ≤ 6                            |
| Детекционные смеси РНК RealPCR (RNA TMx), сухие | Желтый      | 1 x 1 мл   | от -25 °С до 8 °С        | от -25 °С до -15 °С           | ≤ 6                            |

- Важно беречь детекционные смеси от света.
- Восстановите детекционные смеси RealPCR водой для ПЦР перед использованием, и при необходимости разделите на аликвоты, чтобы избежать повторного замораживания/оттаивания. Храните оставшийся материал при температуре ниже -15 °С.

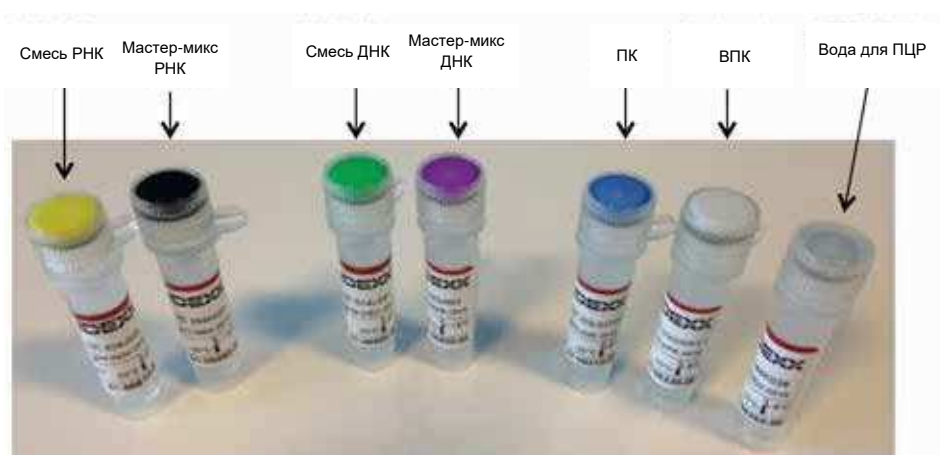
Таблица 5. Стандартные реактивы RealPCR и их хранение

| Название   | Цвет крышки | Количество  | Хранение после получения                                       | Хранение после восстановления | Циклы замораживания/оттаивания |
|--|-------------|-------------|--|-------------------------------|--------------------------------|
| Мастер-микс ДНК* RealPCR (DNA MMx)                     | Фиолетовый  | 1 x 1 мл    | от -25 °С до -15 °С (поставляется при температуре 2 °С-8 °С)   | Н/П                           | ≤ 6                            |
| Мастер-микс РНК RealPCR* (RNA MMx)                     | Черный      | 1 x 1 мл    | от -25 °С до -15 °С (поставляется при температуре 2 °С - 8 °С) | Н/П                           | ≤ 6                            |
| Внутренний положительный контроль (ВПК) RealPCR, сухой | Белый       | 1 x 500 мкл | от -25 °С до 8 °С  | от -25 °С до -15 °С           | ≤ 6                            |
| Положительный контроль (ПК) RealPCR, сухой             | Синий       | 1 x 500 мкл | от -25 °С до 8 °С  | от -25 °С до -15 °С           | ≤ 6                            |
| Вода для ПЦР RealPCR*                                  | Прозрачный  | 2 x 1 мл    | от -25 °С до 8 °С  | Н/П                           | Н/П                            |

- Важно беречь мастер-миксы от света.
- Мастер-миксы RealPCR особенно вязкие; инструкции по обращению см. в отдельных листках-вкладышах к продуктам.
- Восстановите положительный контроль RealPCR и внутренний положительный контроль RealPCR с водой для ПЦР перед использованием, и при необходимости разделите на аликвоты, чтобы избежать повторного замораживания/оттаивания. Храните оставшийся материал при температуре ниже -15 °С.

## Упаковка - маркировка компонентов и система цветов крышек

Рисунок 9. Маркировка и система цветов крышек компонентов RealPCR



## Приготовление к анализу

Смеси для ПЦР готовят путем добавления детекционной смеси и мастер-микса в объемах, соответствующих количеству анализируемых образцов.

Таблица 6а. Реакция RealPCR

| Компонент                            | Объем         |
|--------------------------------------|---------------|
| Мастер-микс                          | 10 мкл        |
| Детекционная смесь                   | 10 мкл        |
| Образец                              | 5 мкл         |
| <b>Общий объем реакционной смеси</b> | <b>25 мкл</b> |

Таблица 6б. Стандартный протокол циклирования ДНК/РНК RealPCR

|                            | Температура | Время  | Количество циклов |
|----------------------------|-------------|--------|-------------------|
| Обратная транскрипция (ОТ) | 50 °С       | 15 мин | 1                 |
| Денатурация                | 95 °С       | 1 мин  | 1                 |
|                            | 95 °С       | 15 сек |                   |
| Аmplификация               | 60 °С       | 30 сек | 45                |

Примечание: Убедитесь, что анализатор настроен на регистрацию флуоресценции после этапа амплификации при температуре 60 °С.

## Анализ методом ПЦР в режиме реального времени и интерпретация данных

Протокол циклирования RealPCR стандартизирован для использования мастер-миксов РНК и ДНК. После каждого отдельного цикла снимаются показания для мониторинга флуоресценции. В первоначальных показаниях собирается фоновая флуоресценция. Она будет варьироваться между анализаторами, но во многих анализаторах для расчета фона используются циклы с 3 по 15.

Если в одном цикле ПЦР выполняется несколько реакций RealPCR, присвойте уникальный идентификатор каждой мишени и внутреннему контролю, используемому в ходе ПЦР. Например, при анализе на присутствие РНК вируса эпидемической диареи свиней (ВЭДС) и РНК вируса трансмиссивного гастроэнтерита (ВТГЭС) на одном планшете, лунки ВЭДС должны анализироваться независимо от лунок ВТГЭС.

Это верно и для внутреннего контроля, используемого для каждой детекционной смеси. См. руководство пользователя конкретного анализатора, чтобы узнать, как анализировать данные. Для установки порогового значения используйте настройку Auto Ct. Убедитесь, что на анализаторе Agilent Mx3000P и Mx3005P для анализа используется метод фоновой пороговой флуоресценции. Для анализаторов Roche LightCycler 480 используйте метод Abs Quant/2nd Derivative Max. Для инструмента QIAGEN Rotor-Gene вручную установите пороговое значение выше фона в линейной фазе экспоненциальной амплификации. Лучше всего это делать на графиках просмотра журнала и требуется для каждого репортера в детекционной смеси.

В определенных ситуациях программное обеспечение присваивает пороговое значение, которое намного ниже фонового, что приводит к отсутствию значений Ct для образцов с типичными кривыми амплификации. В этом случае необходимо вручную установить пороговое значение. Рекомендации по установке порогового значения см. в руководстве производителя анализатора.

Положительный результат образца для системы реактивов RealPCR будет иметь положительное значение Ct и характерную кривую амплификации по сравнению с отрицательным контролем ПЦР.

## Часто задаваемые вопросы

### Модульная платформа RealPCR и компоненты

- В: Почему компоненты поставляются с пакетами со льдом, а некоторые компоненты требуют хранения при температуре от -25 °С до -15 °С?**
- О: Мастер-миксы были протестированы в отношении надлежащей производительности и сохраняют полную активность при поставке на лед. Для обеспечения длительного срока службы этих реактивов после получения мастер-миксы следует хранить при температуре от -25 °С до -15 °С, тогда как другие компоненты могут храниться при температуре от 2 °С до 8 °С. После восстановления высушенных компонентов их также необходимо хранить при температуре от -25 °С до -15 °С.
- В: Необходим ли опыт проведения ПЦР для использования реактивов RealPCR?**
- О: Предыдущий опыт не требуется. Техническая служба IDEXX проводит обучение для всех новых лабораторий, начинающих использовать модульную платформу RealPCR.
- В: Требуются ли отдельные помещения для проведения ПЦР в режиме реального времени и экстракции нуклеиновых кислот?**
- О: Оптимальным является наличие отдельного чистого помещения для подготовки смеси для проведения ПЦР в режиме реального времени и отдельного помещения для экстракции нуклеиновых кислот. Минимальное требование - наличие отдельных лабораторных столов и оборудования (пипетки и т. д.) для этих двух этапов.
- В: Где можно получить сведения о характеристиках реактивов RealPCR?**
- О: Отчеты о валидации для отдельных анализов доступны в Технической службе IDEXX.
- В: Сколько времени требуется для получения результатов при применении платформы RealPCR?**
- О: Проведение ПЦР в режиме реального времени занимает ≤70 минут (в зависимости от анализатора). Экстракция нуклеиновых кислот обычно занимает 1-2 часа, в зависимости от метода экстракции и количества образцов, которые необходимо обработать.
- В: Каков срок хранения компонентов RealPCR?**
- О: Минимальный срок хранения всех компонентов составляет 12 месяцев с даты изготовления.
- В: Какова стоимость создания лаборатории для проведения ПЦР в режиме реального времени?**
- О: Стоимость создания может варьироваться от 20 000 до 70 000 долларов США (от 15 000 до 50 000 евро), в зависимости от уровня автоматизации процесса экстракции нуклеиновых кислот и выбора анализатора для ПЦР в режиме реального времени.
- В: Сколько места в лаборатории необходимо для проведения ПЦР в режиме реального времени?**
- О: Требуется примерно 30–40 кв. футов (3–4 м<sup>2</sup>) лабораторного стола.
- В: Какое оборудование необходимо для создания лаборатории для проведения ПЦР в режиме реального времени?**
- О: Обратитесь в Техническую службу IDEXX для получения справочного перечня необходимого оборудования.
- В: Имеются ли паспорта безопасности материалов (MSDS) для модульных компонентов RealPCR?**
- О: Да. Чтобы запросить паспорт безопасности материала, свяжитесь со службой поддержки клиентов IDEXX.
- В: Какими регулирующими органами одобрены реактивы или анализы?**
- О: Для получения информации о действующих нормативных разрешениях обратитесь в Техническую службу IDEXX.
- В: Реагенты прибыли в лабораторию в замороженном виде. Можно ли их использовать?**
- О: Да. Все компоненты RealPCR стабильны в замороженном виде.
- В: Реактивы прибыли в лабораторию при температуре окружающей среды. Можно ли их использовать?**
- О: В зависимости от продолжительности нахождения при такой температуре. Для некоторых реактивов прибытие при температуре окружающей среды является нормальным. Обратитесь в Техническую службу IDEXX для получения рекомендаций.

### Экстракция

- В: Можно ли использовать архивные образцы?**
- О: Да. Однако для детекционных смесей RealPCR, в которых используется ВКО, увеличенное время хранения может ухудшить РНК/ДНК хозяина. Это может привести к отрицательному результату ВКО. Это также верно для нуклеиновой кислоты и ткани, хранящейся в течение длительного периода времени.
- В: Обнаруживает ли ВКО-мишень для РНК-реактива в том числе и ДНК?**
- О: Нет. Детекционные смеси для РНК RealPCR, в которых используется эндогенная мишень ВКО хозяина, обнаруживают только РНК хозяина.
- В: Способны ли детекционные смеси RealPCR обнаруживать ВКО-мишени в сыворотке?**
- О: Да. Детекционные смеси RealPCR, предназначенные для сыворотки, хорошо определяют ВКО-мишень в сыворотке.

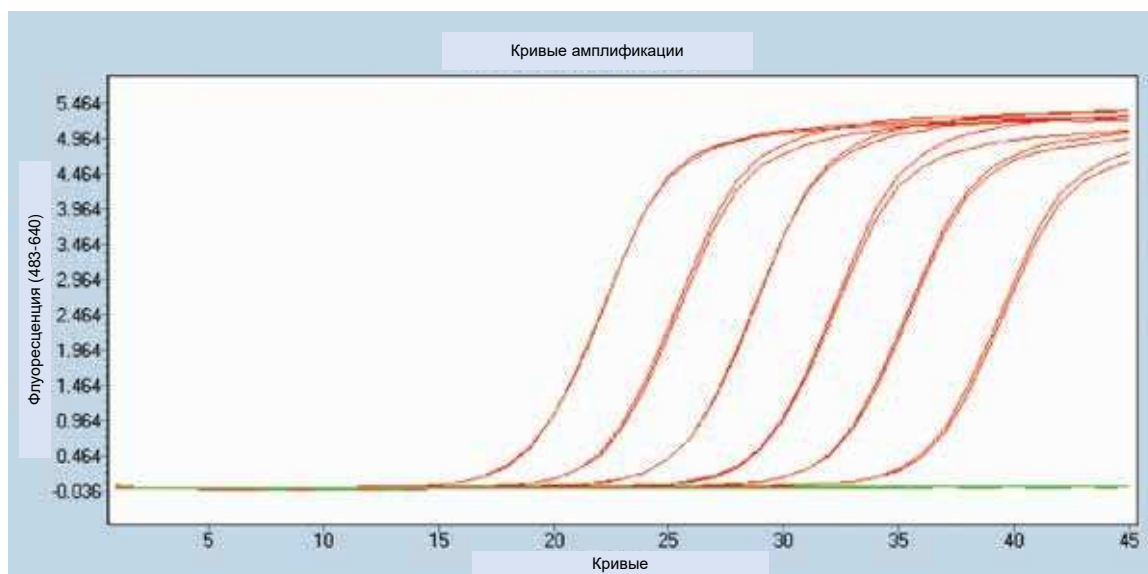
- В: В чем разница между отрицательным контролем ПЦР и отрицательным контролем экстракции?**
- О: Отрицательный контроль ПЦР используется для того, чтобы убедиться в отсутствии контаминации каждого из реактивов для ПЦР. Он также может быть индикатором контаминации, возникающей при добавлении образца в планшет для ПЦР. Отрицательный контроль экстракции контролирует потенциальную контаминацию отрицательных образцов от резкоположительных образцов во время экстракции нуклеиновых кислот.
- В: Какой тип образцов можно использовать с реактивами RealPCR?**
- О: Типы образцов указаны во вкладышах к каждой детекционной смеси RealPCR.
- В: Можно ли использовать объединенные образцы с реактивами RealPCR?**
- О: Да. Объединенные образцы можно использовать для некоторых детекционных смесей RealPCR и типов образцов. Для получения подробной информации см. вкладыши к продуктам.
- В: Каков риск контаминации при проведении ПЦР в режиме реального времени?**
- О: Риск контаминации увеличивается, когда реакционные смеси приготавливаются в непосредственной близости от места экстракции нуклеиновых кислот или работы с образцами. IDEXX предоставляет руководство по созданию программы мониторинга контаминации среды лаборатории.
- В: Можно ли использовать наборы для экстракции или анализаторы для ПЦР в режиме реального времени, помимо утвержденных IDEXX, с реактивами RealPCR?**
- О: Во вкладышах к отдельным продуктам перечислены валидированные методы экстракции и анализаторы. Рекомендуется при использовании протоколов, не указанных во вкладыше к продукту, сначала выполнить валидацию метода. Для клиентов из Северной Америки: свяжитесь с технической службой IDEXX, чтобы запросить отчет с данными об эксплуатационных характеристиках, в котором резюмированы исследования для каждого набора реактивов.
- В: Можно ли использовать буфер для экспресс-лизиса RealPCR для всех экстракций нуклеиновых кислот?**
- О: Нет, буфер для экспресс-лизиса RealPCR валидирован для использования только с конкретными детекционными смесями RealPCR и типами образцов.

## ПЦР

- В: Почему в протоколе циклирования RealPCR 45 циклов?**
- О: Платформа RealPCR была разработана с 45 циклами для обеспечения совместимости с максимально возможным количеством анализаторов. Хотя не для всех анализов и/или анализаторов требуется 45 циклов, RealPCR является стандартизированной системой; таким образом, все анализы были валидированы по одному и тому же протоколу.
- В: Следует ли добавлять компоненты в реакционную смесь в определенном порядке?**
- О: Да, смесь для ПЦР готовится путем добавления соответствующего мастер-микса к детекционной смеси. Для РНК-реактивов рекомендуется добавлять мастер-микс для РНК в детекционную смесь при помощи пипетки, чтобы можно было промыть ее кончик. Смесь для ПЦР должна быть подготовлена до работы с образцами.
- В: Почему кривые амплификации ВКО и ВПК меньше?**
- О: Для внутреннего контроля используется другой краситель, который имеет более низкий квантовый выход.
- В: Что может привести к отрицательному результату ВКО?**
- О: К отрицательному сигналу ВКО могут привести многие факторы:
- Ненадлежащий сбор образцов
  - Неудачная процедура экстракции
  - Экстракция с избыточным количеством ингибиторов ПЦР
  - Сильная мишень, подавляющая амплификацию ВКО
  - Образец не был добавлен в реакцию ПЦР. В случае отрицательного результата для мишени/отрицательного результата для ВКО (недействительный результат) важно устранить проблему. Положительный результат для мишени/отрицательный результат для ВКО остается действительным результатом для реактива.
- В: Я постоянно получаю положительные результаты для образцов в лунках, содержащих только реакционную смесь и воду. Почему?**
- О: Реактивы RealPCR чрезвычайно чувствительны к присутствию нуклеиновых кислот. Любая контаминация может легко привести к ложноположительному результату. Ниже приведены рекомендации по контролю контаминации.
- Уделять внимание правильной технике пипетирования; избегать образования аэрозолей.
  - Выделите отдельные лабораторные зоны и оборудование для приготовления смесей для ПЦР и добавления образцов.
  - Контролируйте рабочий поток персонала, чтобы свести к минимуму перенос загрязнений в чистые зоны работы со смесями для ПЦР.
  - Утилизируйте использованные реакционные планшеты в емкости, расположенные в зоне, находящейся вдали от зоны приготовления смесей для ПЦР.

**В:** Как должна выглядеть нормальная кривая амплификации?

**О:** Типичная кривая амплификации должна иметь характерную сигмоидальную форму. На рисунке ниже изображены кривые амплификации для десятикратного серийного разведения матрицы.



**В:** Большинство моих кривых амплификации имеют плавную сигмоидальную форму. Однако иногда я вижу неправильные кривые. Это действительно положительные результаты?

**О:** В редких случаях отрицательная кривая амплификации может быть обнаружена программным обеспечением термоциклера как положительная, но при этом отсутствует характерный сигмоидальный вид, который указывает на истинное экспоненциальное увеличение количества ДНК, которое происходит во время успешной ПЦР. Эти неправильные кривые часто вызваны флуоресценцией, не связанной с амплификацией. IDEXX рекомендует повторно проанализировать образцы с поздним значением Ct, в которых отсутствует кривая амплификации.

**В:** Почему свободный зонд не излучает сигнал?

**О:** Свободный или несвязанный зонд излучает сигнал. Однако флуорофор обычно гасится и поэтому не обнаруживается оптической системой анализатора для ПЦР в режиме реального времени. Только после разрушения зонда флуорофор не гасится и позволяет сигналу достигать детектора анализатора.

**В:** Может ли зонд разрушиться, даже если он не отожен до мишени (т. е. отрицательный образец)?

**О:** Если детекционная смесь загрязняется, возможно, что зонд разрушится и, следовательно, приведет к отсутствию гашения флуорофора. В этом случае интенсивность сигнала будет очень высокой даже на ранних циклах стадии ПЦР. По этой причине IDEXX рекомендует разделять детекционную смесь на аликвоты, тем самым минимизируя манипуляции, и проверять, чтобы кривые амплификации имеют сигмоидальную форму.

**В:** Что произойдет, если в лунке для ПЦР появится пузырек? Что произойдет с кривой?

**О:** На кривой амплификации можно увидеть быстрый скачок. Нормализация с помощью ROX часто может решить проблему для анализаторов, в которых используется ROX.

**В:** Каков соответствующий ответ на позднее положительное значение Ct (например, Ct = 42)?

**О:** Перед сообщением окончательного результата оцените кривую амплификации. При отсутствии характерного сигнала, вызванного амплификацией, это может быть отрицательный образец. Если результат неочевиден, образец следует проанализировать повторно.

**В:** Что такое пороговое значение Ct для положительных образцов?

**О:** Для большинства реактивов RealPCR не приводится конкретное пороговое значение Ct из-за различий в алгоритмах программного обеспечения анализаторов для определения значения Ct. Кривые амплификации следует проверять визуально, особенно для образцов со слабым значением Ct.

**В:** В некоторых анализах наблюдается подозрительное пороговое значение; каковы рекомендации для этих образцов?

**О:** Образцы со значением Ct позже предполагаемого порогового значения могут быть положительными или являться результатом контаминации. Анализ кривой амплификации может показать, является ли образец истинно положительным. Чтобы исключить контаминацию, может потребоваться повторная экстракция. При подозрении на контаминацию см. стр. 14 для получения инструкций по организации рутинного лабораторного мониторинга.

## Требования к термоциклеру

- В: Когда следует использовать внутренний положительный контроль RealPCR?**  
О: В большинстве детекционных смесей RealPCR используется внутренний контроль образца, который устраняет необходимость во внутреннем положительном контроле. Однако в некоторых детекционных смесях используются типы образцов (например, образцы окружающей среды), которые содержат переменные или ограниченные количества ДНК или РНК хозяина. В этом случае рекомендуется применение внутреннего положительного контроля.
- В: Какие планшеты и крышки для ПЦР использовать с платформой RealPCR?**  
О: Марка планшета для ПЦР и крышки зависит от используемого анализатора в режиме реального времени. Следуйте рекомендациям производителя.
- В: Каковы рекомендации по калибровке анализаторов для ПЦР в режиме реального времени?**  
О: Оптику и термические параметры анализатора следует калибровать в соответствии с рекомендациями его производителя. В некоторых регионах может потребоваться привлечение сторонней компании для проведения термической калибровки. Для получения дополнительной информации о калибровке свяжитесь с Технической службой IDEXX.
- В: При программировании анализатора, что следует использовать для гасителя, если гаситель флуоресценции типа «чёрная дыра»\* (Black Hole Quencher, BHQ\*) не указан в качестве опции?**  
О: Вы также можете использовать нефлуоресцентный гаситель (NFQ) или просто выбрать «нет».
- В: Какие фильтры требуются в анализаторе для кПЦР для использования реактивов RealPCR?**  
О: Для всех реактивов RealPCR требуются FAM и HEX. Канал Cy5 необходим для двухмишеневых мультиплексных детекционных смесей, а канал ROX используется в некоторых анализаторах для нормализации сигнала.
- В: Требуется ли отдельное программное обеспечение для интерпретации результатов?**  
О: Нет, для интерпретации результатов используйте программное обеспечение анализатора для ПЦР в режиме реального времени.



## Определения

Ампликон: Результат ПЦР-амплификации.

Амплификация: Экспоненциальное размножение ДНК-мишени с помощью ПЦР.

Отжиг: Происходит, когда комплементарные последовательности одноцепочечной ДНК или РНК соединяются водородными связями образуют двухцепочечную ДНК.

Температура отжига: Температура, при которой происходит отжиг (см. *Отжиг* выше).

Фильтр канала: Выбирает подходящие длины волн для излучения и возбуждения в анализаторах для ПЦР в режиме реального времени в соответствии с флуорофорами, используемыми в реакции.

Комплементарная цепь: Любая из двух цепей, составляющих двойную спираль ДНК, при этом соответствующие положения на двух цепях состоят из пары комплементарных оснований.

Значение  $C_t$  = значение  $C_q$  = значение  $C_p$ : Количество циклов, необходимое для достижения заданного порогового уровня сигнала флуоресценции. Денатурация: Нагревание реакции для разделения цепей ДНК за счет разрыва водородных связей между комплементарными основаниями, в результате чего образуются одноцепочечные молекулы ДНК.

Дезоксирибонуклеаза (ДНКаза): Фермент, катализирующий гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей в основной цепи ДНК, тем самым разрушая ДНК.

ДНК: Дезоксирибонуклеиновые кислоты, кодирующие генетическую информацию живых организмов и многих вирусов. ДНК-полимераза: Фермент, синтезирующий цепи ДНК из нуклеотидов.

Излучение: Действие флуорофора для ПЦР в режиме реального времени, излучающего свет в ответ на поглощение света определенной длины волны (см. *Возбуждение*).

Эндогенный: В случае внутреннего контроля образца (ВКО) «эндогенный» относится к собственному генетическому материалу хозяина. Использование эндогенной мишени-хозяина, такой как ВКО, обеспечивает контроль добавления образца, качества образца, правильную экстракцию и успешную амплификацию.

Возбуждение: В ПЦР в режиме реального времени оно относится к длине волны света, используемой для побуждения флуорофора к излучению света (см. *Излучение*). Удлинение: Этап или процесс, на котором ДНК-полимераза синтезирует новую цепь ДНК, комплементарную цепи ДНК-матрицы в направлении от 5' к 3'.

Флуоресценция: Излучение света материалом, поглотившим свет. В ПЦР в режиме реального времени флуоресценция измеряется для определения относительного количества ДНК в реакции.

Выдержка: Один температурный этап в кПЦР-анализаторе.

Гидролизуемый зонд: Короткий синтетический олигонуклеотид, предназначенный для идентификации определенной целевой последовательности ДНК. Включает репортер и гаситель и излучает флуоресценцию после расщепления ДНК-полимеразой во время амплификации.

Внутренний контроль (ВК): Целевая последовательность РНК или ДНК, добавляемая в приготовленную смесь для ПЦР. ВК обеспечивает положительный контроль активности обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы.

Внутренний положительный контроль (ВПК): Целевая последовательность РНК или ДНК, которая вводится в раствор для лизиса образца и очищается вместе с нуклеиновыми кислотами образца. ВПК контролирует правильную экстракцию нуклеиновых кислот и правильное функционирование обратной транскриптазы.

(РНК-мишени) и ДНК-полимераза.

Внутренний контроль образца (ВКО): Целевая последовательность РНК или ДНК, эндогенная или присущая образцу-хозяину. ВКО контролирует присутствие образца, качество образца, эффективность экстракции, активность обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы.

Мастер-микс: Мастер-миксы для ПЦР представляют собой предварительно смешанные, готовые к использованию растворы, содержащие ДНК-полимеразу, дНТФ,  $MgCl_2$  и реакционные буферы в оптимальных концентрациях для эффективной амплификации ДНК-матриц с помощью ПЦР. Мастер-миксы РНК также включают обратную транскриптазу для преобразования РНК в кДНК.

Температура плавления: Температура, при которой 50% всех молекул ДНК данной последовательности присутствуют в виде двухцепочечных, а 50% - в виде одноцепочечных.

### Определения (продолжение)

Отрицательный контроль (ОК): Отрицательный контроль для ПЦР подтверждает отсутствие перекрестной контаминации между образцами или контаминации реактивов для ПЦР, анализаторов или среды.

Отрицательный контроль экстракции (ОКЭ): Имитационный образец, обычно вода, которую можно использовать для определения наличия перекрестной контаминации между образцами в процессе экстракции. Рекомендуется включать 1 ОКЭ на каждые 19 образцов, обрабатываемых для очистки нуклеиновых кислот.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР): Процесс, при котором молекулы ДНК экспоненциально копируются путем изменения температуры реакции для достижения детектируемого уровня ДНК.

Положительный контроль (ПК): Положительный контроль ПЦР подтверждает правильность работы всех реактивов и оборудования для ПЦР. Праймер: Короткая синтетическая цепь ДНК, которая служит отправной точкой для амплификации ДНК.

Скорость: Время, необходимое для повышения/понижения температуры в рамках протокола циклирования ПЦР.

ПЦР в режиме реального времени: Обычный инструмент для амплификации, обнаружения и одновременного количественного определения конкретной молекулы-мишени ДНК.

Рибонуклеаза (РНКаза): Нуклеаза, катализирующая распад РНК.

РНК: Цепи рибонуклеиновой кислоты, передающие генетические инструкции от ДНК к трансляции белков. РНК также содержит генетическую информацию многих вирусов.

ROX: Пассивный эталонный краситель, который используется для нормализации флуоресцентного репортерного сигнала в количественной ПЦР в режиме реального времени и чья флуоресценция не изменяется во время реакции.

ПЦР-ОТ: Обратная транскрипция целевой РНК в кДНК с использованием фермента обратной транскриптазы; затем кДНК можно использовать для ПЦР.

Стандартная программа циклирования: Единая программа ПЦР, которую можно использовать для нескольких мишеней РНК и ДНК.

Пороговое значение: Предварительно установленный уровень немного выше флуоресцентного фона для обнаружения флуоресценции, вызванной ДНК.

Длина волны: Физическая характеристика, используемая для описания возбуждения и излучения флуоресцентных красителей, используемых в ПЦР в режиме реального времени. Единица измерения - нанометры (нм).



Приобретение продуктов RealPCR предоставляет покупателю права в соответствии с некоторыми патентами Roche, относящимися к амплификации и/или обнаружению нуклеиновых кислот. Этот продукт не предназначен для использования в медицинской диагностике in vitro, разведении животных, идентификации животных или тестировании на ГМО. Настоящим не предоставляется никаких общих патентов или иных лицензий любого рода, кроме данного конкретного права на использование с момента покупки.

Некоторые красители в детекционных смесях RealPCR продаются по лицензии компании Biosearch Technologies, Inc. и защищены выданными или заявленными патентами США и других стран. Лицензия распространяется на применение в ветеринарии.

Не предназначено для медицинской диагностики in vitro.



**IDEXX Laboratories, Inc.**  
Мировая штаб-квартира  
One IDEXX Drive  
Уэстбрук, Мэн 04092  
США  
Тел.: +1 207 556 4890 или  
+1 800 548 9997  
Факс: +1 207 556 4826 или  
+1 800 328 5461

**IDEXX Europe B.V.**  
Штаб-квартира в Европе  
Scorpius 60 Building F  
2132 LR Hoofddorp  
Нидерланды  
Тел.: +31 23 558 70 00 или  
+800 727 43399  
Факс: +31 23 558 72 33

**IDEXX Laboratories, Inc.**  
Штаб-квартира в Азии  
3F-5 No. 88, Rei Hu Street  
Nei Hu District  
11494 Тайбэй  
Тайвань  
Тел.: +886 2 6603 9728  
Факс: +886 2 2658 8242

**IDEXX Brasil**  
Штаб-квартира в Бразилии  
1478 Av. Brig. Faria Lima  
Сан-Паулу, Сан-Паулу  
Бразилия  
Тел.: +55 11 3095-5632  
Факс: +55 11 3095-5641

**Test with Confidence™**

© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. Все права защищены. • 09-80571-02-EN-L  
\*IDEXX, Test with Confidence и RealPCR являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками компании IDEXX Laboratories, Inc. или ее аффилированных компаний в США и/или других странах. LightCycler является зарегистрированной торговой маркой компании Roche Diagnostics GmbH. FAM и HEX являются торговыми марками компании Arplera Corporation или ее дочерних компаний в США и/или некоторых других странах. AriaMx, Mx3000P и Mx3005P являются торговыми марками компании Agilent Technologies, Inc. Applied Biosystems, DNAZap, MagMAX, ROX и ViiA являются торговыми марками компании Life Technologies Corporation. QIAGEN, QIAamp, Rotor-Gene и RNeasy являются торговыми марками компании QIAGEN Group. NucleoMag является зарегистрированной торговой маркой компании MACHERY-NAGEL GmbH & Co KG. DNA AWAY является торговой маркой или зарегистрированной торговой маркой компании Thermo Fisher Scientific. Black Hole Quencher и BHQ являются торговыми марками компании Biosearch Technologies, Inc. Все остальные названия продуктов и компаний и логотипы являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками соответствующих владельцев. Политика конфиденциальности компании IDEXX доступна на сайте [idexx.com](http://idexx.com).

## Перечень оборудования RealPCR

Используйте приведенный ниже контрольный перечень, чтобы убедиться, что ваша лаборатория полностью оборудована для проведения анализов RealPCR\*. При возникновении вопросов обращайтесь в Техническую службу компании IDEXX по телефону 1-800-548-9997.

### Пространство лаборатории

IDEXX рекомендует выделить 3-4 помещения для анализов RealPCR:

- Помещение для экстракции: Отдельное помещение среднего размера с лабораторным столом для процедуры экстракции
- Чистое помещение: Небольшое отдельное помещение только для приготовления реактивов; минимальное необходимое пространство лабораторного стола; рекомендуется вытяжной шкаф
- Зона приготовления образцов. Либо отдельное помещение, либо зона с вытяжным шкафом в основной лаборатории.
- Помещение для проведения анализов: Остаток основного пространства лаборатории

**ВАЖНО:** Лабораторное оборудование для каждого помещения должно оставаться предназначенным для этого помещения.

## Помещение для экстракции

Оборудование и расходные материалы будут различаться в зависимости от используемого метода экстракции.

| Лабораторное оборудование и расходные материалы   | Примечания |
|---|------------|
| <b>Лабораторное оборудование</b>  |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Вытяжка микробиологической защиты или бокс микробиологической безопасности</li> <li>В зависимости от метода экстракции может потребоваться морозильная камера/холодильник.</li> </ul>  |            |
| <b>Ручная колоночная экстракция РНК</b>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Микроцентрифуга (30 000 x g; 17 500 об/мин) с ротором для пробирок объемом 2 мл</li> <li>Вортекс (встряхиватель)</li> <li>Штатив для пробирок объемом 1,5 мл, 15 мл и 50 мл</li> <li>Пробирки объемом 1,5 мл</li> <li>Пробирки объемом 15 мл</li> <li>Пробирки объемом 50 мл</li> <li>Блочный термостат</li> </ul> |            |
| <b>Автоматическая экстракция ДНК/РНК</b>  |            |
| Система KingFisher* Flex 96 OR<br>Магнитный процессор MagMAX * Express-96<br><i>Примечание: Используйте только пластмассы, рекомендованные в руководстве KingFisher или MagMAX.</i>   |            |
| <b>Пипетки</b>  |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Электронный дозатор (пипеточный дозатор)</li> <li>Ручной дозатор объемом 100-1000 мкл</li> <li>Ручной дозатор объемом 10-100 мкл</li> <li>Дозатор-репитер (факультативно)</li> </ul>   |            |
| <b>Наконечники для дозаторов</b><br><i>Выберите того же производителя, что и производитель пипеток.</i>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Наконечники для пипеточного дозатора</li> <li>Наконечники для дозатора объемом 100-1000 мкл</li> <li>Наконечники для дозатора объемом 10-100 мкл</li> </ul>  |            |
| <b>Прочее</b>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Латексные перчатки</li> <li>Лабораторный халат</li> <li>Одноразовые бахилы (факультативно)</li> <li>Шапочки для волос (факультативно)</li> <li>Раствор для разрушения нуклеаз и нуклеиновых кислот</li> <li>Таймер</li> </ul>  |            |

## Чистое помещение

| Лабораторное оборудование и расходные материалы  | Примечания |
|--|------------|
| <b>Лабораторное оборудование</b>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Морозильная камера с температурой -20 °С</li> <li>• Портативное чистое помещение и ламинарный вытяжной шкаф (с положительным давлением)</li> </ul>                                    |            |
| <b>Подготовка реактивов для ПЦР в режиме реального времени</b>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Вортекс (встряхиватель)</li> <li>• Штатив для пробирок объемом 1,5 мл</li> <li>• Миницентрифуга</li> <li>• Пробирки объемом 1,5 мл</li> </ul>   |            |
| <b>Дозаторы (выберите одно из следующего):</b>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Дозатор объемом 100-1000 мкл</li> <li>• Дозатор объемом 10-100 мкл</li> </ul>   |            |
| <b>Наконечники для дозаторов</b>   |            |
| <i>Выберите того же производителя, что и производитель дозатора.</i>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наконечники для дозатора объемом 100-1000 мкл</li> <li>• Наконечники для дозатора объемом 10-100 мкл</li> </ul>   |            |
| <b>Прочее</b>  |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Латексные перчатки</li> <li>• Лабораторный халат</li> <li>• Одноразовые бахилы</li> <li>• Шапочки для волос</li> <li>• Раствор для разрушения нуклеаз и нуклеиновых кислот</li> </ul> |            |


## Помещение для приготовления образцов/проведения анализа

| Лабораторное оборудование и расходные материалы  | Примечания |
|--|------------|
| <b>Лабораторное оборудование</b>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Портативное чистое помещение и ламинарный вытяжной шкаф (с положительным давлением)</li> <li>• ПЦР-анализатор в режиме реального времени (выберите один)<br/>(Убедитесь в наличии соответствующих откалиброванных наборов фильтров для анализов RealPCR.)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Agilent Mx3000P/Mx3005P/AriaMx*</li> <li>○ Applied Biosystems* 7500/7500 FAST/ViiA* 7</li> <li>○ Roche LightCycler* 480/LightCycler* 2.0</li> <li>○ Bio-Rad CFX96*</li> <li>○ QIAGEN* Rotor-Gene Q (72-луночный ротор)</li> </ul> </li> <li>• Компьютер</li> <li>• Вortex (встряхиватель)</li> <li>• Штатив для пробирок объемом 1,5 мл</li> <li>• Миницентрифуга</li> <li>• Центрифуга для планшетов (факультативно)</li> </ul> |            |
| <b>Пипетки</b>   |            |
| <i>Пожалуйста, выберите одно из следующего</i>   |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Многоканальный дозатор объемом 2-10 мкл (факультативно, в зависимости от метода экстракции)</li> <li>• Дозатор объемом 2-10 мкл</li> <li>• Дозатор объемом 20 мкл</li> <li>• Дозатор объемом 1000 мкл</li> </ul>  |            |
| <b>Наконечники пипеток</b>   |            |
| <i>Выберите того же производителя, что и производитель пипетки.</i>  |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наконечники для дозатора объемом 2-10 мкл</li> <li>• Наконечники для дозатора объемом 20 мкл</li> <li>• Планшеты и крышки планшетов для ПЦР в режиме реального времени.<br/>Подтвердите тип, необходимый для вашего анализатора для ПЦР в режиме реального времени</li> </ul>   |            |
| <b>Прочее</b>  |            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Латексные перчатки</li> <li>• Раствор для разрушения нуклеаз и нуклеиновых кислот</li> </ul>  |            |



# Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR\* с применением спин-колонок

Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR с применением спин-колонок

 99-56103

 Версия

06-56103-00

Test with Confidence™

**IDEXX**





# Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR\* с применением спин-колонок

## Наименование и предусмотренное применение

Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR с применением спин-колонок предназначен для выделения ДНК и РНК из широкого спектра типов образцов, включая сыворотку, плазму, цельную кровь, мазки из трахеи, пероральную жидкость, фекалии, ткань выщипов уха, суспензии гомогенизированных тканей и образцы окружающей среды.

## Общая информация

Набор содержит реактивы и спин-колонок для приготовления 50 образцов. Образцы сначала обрабатывают лизирующим буфером (ЛБ) и протеиназой К (ПК) для высвобождения ДНК/РНК и инактивации нуклеаз. Добавление этанола создает подходящие условия для связывания нуклеиновых кислот с субстратом спин-колонки с кварцевой мембраной. РНК-носитель (РНК) может улучшить связывание небольших количеств нуклеиновых кислот с кварцевой колонкой. РНК-носитель может мешать некоторым последующим этапам, таким как синтез кДНК, и поэтому может считаться необязательным. Для RealPCR применение РНК-носителя было валидировано для всех типов образцов, описанных ниже. Контаминанты и потенциальные ингибиторы смываются на последующих этапах растворами для промывания 1 и 2 (W1 и W2). Нуклеиновые кислоты элюируются из колонки небольшим объемом воды для элюирования (H<sub>2</sub>O) и готовы к использованию в ПЦР-анализе.

Материалы и хранение (Информация по безопасности содержится на стр. EN-6)

| Компонент   |  | Количество  | Хранение  |                          |
|---|--|-------------|---|--------------------------|
| ПК  | Протеиназа К   | 500 мкл     | При получении   | После первого применения |
|   |  |             | 2–26°C  | от -25 °C до -15 °C      |
| РНК   | РНК-носитель (колонки), лиофилизированная            | 2 x 300 мкл | При получении   | После восстановления     |
|   |  |             | 2–26°C  | от -25 °C до -15 °C      |
| ЛБ  | Лизирующий буфер (Колонки)                           | 20 мл       | 18–26°C   |                          |
| W1  | Раствор для промывания 1 (колонки)                   | 25 мл       | Набор может быть отправлен/получен при более низких температурах (2–26 °C). |                          |
| W2  | Раствор для промывания 2 в концентрации 5x (колонки) | 12 мл       |   |                          |
| H <sub>2</sub> O  | Вода для элюирования                                 | 10 мл       |   |                          |
| СК  | Спин-колонок   | 50          |   |                          |
| Пробирки для сбора образцов (2 мл)                      |  | 150         |   |                          |
| Флаконы для сбора образцов (1,5 мл) Лизис и элюирование |  | 100         |   |                          |



### **Необходимые материалы (не входят в комплект)**

- Этанол (96-100%), степень чистоты которого соответствует стандарту ACS, или аналогичный
- Центрифуга для микроцентрифужных пробирок
- Вихревой смеситель
- Термостат или водяная баня
- Средства индивидуальной защиты (перчатки, защитные очки, лабораторный халат)
- Не содержащие нуклеаз, устойчивые к аэрозолям наконечники для пипеток
- Дозаторы(5–1000 мкл)
- Факультативно - вода для ПЦР\*
- Факультативно - фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 (ФСБ)\*
- Факультативно - буфер RealPCR TL-60\*
- Факультативно - 1М дитиотреитол (ДТТ)\*

\* См. Раздел «Приготовление образцов для использования».

### **Лабораторные практики и предупреждения**

- Не используйте реактивы с истекшим сроком годности.
- При работе с реактивами и нуклеиновыми кислотами пользуйтесь неопудренными перчатками.
- Во избежание перекрестной контаминации используйте не содержащие нуклеаз, устойчивые к аэрозолям наконечники для пипеток и физически разделите рабочие места для экстракции/обработки нуклеиновых кислот, подготовки к ПЦР и проведения ПЦР.
- Буферы ЛБ и W1 содержат хаотропные соли. Во время работы с ними используйте соответствующие средства индивидуальной защиты (перчатки, защитные очки, лабораторный халат и т. д.).
- См. дополнительную информацию по безопасности в конце этого документа.

### **Общие положения:**

#### **Качество образцов**

Для успешной экстракции нуклеиновых кислот важно получить однородный, прозрачный и невязкий образец перед загрузкой в спин-колонок для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR.

Отрицательный контроль экстракции

Рекомендуется включать в каждый набор обработанных экстракций отрицательный контроль экстракции (вода или ФСБ).

#### **Приготовление реактивов**

Примечание: Лизирующий буфер и раствор для промывания 1 содержат компоненты, которые будут выпадать в осадок при хранении при низких температурах. Перед тем как приступить к приготовлению, осмотрите эти два компонента. Если наблюдается выпадение осадка, нагрейте раствор до 37 °С, чтобы растворить выпавшие соли.

#### **Восстановление лиофилизированной РНК-носителя (РНК)**

Перед использованием добавьте 300 мкл воды для элюирования (H<sub>2</sub>O) во флакон с РНК-носителем, тщательно перемешайте и пометьте на этикетке, что вода была добавлена. Храните восстановленную РНК-носитель в аликвотах при температуре от –25 до –15 °С.

#### **Протеиназа К (ПК)**

Протеиназа К поставляется готовой к использованию; после первого применения раствор ПК следует хранить в аликвотах при температуре от –25 до –15 °С.

#### **Приготовление раствора для промывания 2 в концентрации 1X (W2)**

Добавьте 48 мл 96–100% этанола в бутылку с раствором для промывания с концентрацией 5X. Тщательно перемешайте и пометьте на этикетке, что этанол был добавлен.

#### **Вода для элюирования (H<sub>2</sub>O)**

Перед элюированием нуклеиновой кислоты нагрейте воду для элюирования до температуры 70 °С ± 5 °С с помощью термостата или водяной бани.

Все остальные компоненты поставляются готовыми к использованию и должны храниться при температуре 18–26 °С до истечения срока годности.

## Приготовление образцов

---

Кровь, сыворотка и плазма

Используйте 200 мкл ( $\pm 5$  мкл) образцов крови, сыворотки или плазмы.

---

### Образцы ткани

Гомогенизируйте образец ткани; осветлите по мере необходимости. Для процедуры экстракции используйте 200 мкл образца.

---

#### Ткань выщипа уха

1. Приготовьте раствор RealPCR TL-60 † и ДТТ, объединив 250 мкл ( $\pm 5$  мкл) буфера TL-60 и 10 мкл 1М ДТТ для каждой экстракции.

2. Добавьте 250 мкл ( $\pm 5$  мкл) TL60/ДТТ в каждый образец ткани уха.

3. Перемешивайте в вихревом смесителе в течение 10 секунд.

4. Выдержите при температуре 18–26 °С в течение 30-60 минут.

5. Перемешивайте в вихревом смесителе в течение 10 секунд.

6. Используйте 200 мкл ( $\pm 5$  мкл) раствора ткани уха в качестве образца для экстракции нуклеиновой кислоты.

† RealPCR TL-60 продается отдельно - см. Информацию для заказа.

---

### Мазки из трахей

Замочите тампоны в 400–500 мкл ФСБ. Используйте 200 мкл ( $\pm 5$  мкл) раствора, в котором замачивались тампоны, для экстракции нуклеиновых кислот.

---

### Образцы кала

#### Мазки кала:

1. Замочите тампон в 1 мл ( $\pm 100$  мкл) ФСБ.

2. Энергично перемешайте экстракт в вихревом смесителе в течение 30 секунд.

3. Дайте твердым частицам осесть в течение примерно 5 минут или кратковременно центрифугируйте на низкой скорости (500 x g).

4. Используйте 200 мкл ( $\pm 5$  мкл) надосадочной жидкости для экстракции нуклеиновых кислот.

Образцы кала, требующие бактериального лизиса:

Может потребоваться механическое разрушение при помощи гранул. Следуйте протоколу производителя. Используйте 200 мкл ( $\pm 5$  мкл) гомогенизированного образца для экстракции нуклеиновых кислот.

---

### Пероральные жидкости

Используйте 200 мкл ( $\pm 5$  мкл) пероральной жидкости для экстракции нуклеиновых кислот.

---

### Обогащенные культуры

Используйте 200 мкл ( $\pm 5$  мкл) обогащенной культуры для экстракции нуклеиновых кислот.

- 1 1. Рабочий раствор для лизиса, 200 мкл  
Расчет рабочего раствора для лизиса:  
Объем реактива на образец  
Лизирующий буфер (ЛБ) 190 мкл  
РНК-носитель (РНК) 5 мкл  
Протеиназа К (ПК) 5 мкл  
2. 200 мкл образца  
3. Перемешать, выдержать 3 минуты при температуре 18–26 °С.  
4. Центрифугировать в течение непродолжительного времени

---

- 2 1. 200 мкл этанола  
2. Перемешать, выдержать ~5 минут при температуре 18–26 °С.  
3. Центрифугировать в течение непродолжительного времени

---

- 3 1. Перенести лизат (~ 600 мкл) в колонку  
2. 8,000 x g, 3 минуты.

---

- 4 1. 400 мкл раствора W1; 11000 x g, 30 секунд  
2. 400 мкл раствора W2; 11000 x g, 30 секунд  
3. 200 мкл раствора W2; 20000 x g, 2 минуты

---

- 5 1. 50 мкл воды для элюирования при температуре 70 °С  
2. Выдержать ~1 мин при температуре 18–26 °С.  
3. 20 000 x g, 1 мин, собрать элюат

См. подробный протокол ниже.

## Протокол экстракции ДНК/РНК методом RealPCR с применением спин-колонок

### Лизис

1. Рассчитайте количество рабочего раствора для лизиса, которое нужно приготовить. Подготовьте дополнительно 10%, чтобы учесть потери при пипетировании. Расчет рабочего раствора для лизиса:  
Объем реактива на образец  
Лизирующий буфер (ЛБ) 190 мкл  
РНК-носитель (РНК) 5 мкл  
Протеиназа К (ПК) 5 мкл
2. Приготовьте рабочий раствор для лизиса, смешав реактивы в указанном ниже порядке. Факультативно - при использовании внутреннего положительного контроля RealPCR его следует добавить в рабочий раствор для лизиса.
3. Перед использованием тщательно перемешайте рабочий раствор для лизиса путем переворачивания. При слишком энергичном перемешивании раствор вспенивается. Перед использованием хранить при температуре 18–26 °С в течение не более 1 часа. Более длительное время хранения может привести к снижению эффективности лизиса.
4. Добавьте 200 мкл ( $\pm$  5 мкл) рабочего раствора для лизиса в пробирку для сбора объемом 1,5 мл для каждого экстрагируемого образца.
5. Добавьте во флаконы 200 мкл ( $\pm$  5 мкл) образца.
6. Перемешайте в вихревом смесителе или несколько раз при помощи дозатора.
7. Выдержите при температуре 18–26 °С в течение 3 минут.
8. Кратковременно центрифугируйте флаконы до оседания содержимого.

### Корректирование условий для связывания

1. Добавьте в каждый флакон 200 мкл ( $\pm$  5 мкл) этанола.
2. Перемешайте путем встряхивания (около 10 сек).
3. Выдержите в течение примерно 5 мин при температуре 18–26 °С.
4. Кратковременно центрифугируйте флаконы до оседания содержимого.

### Связывание нуклеиновых кислот

1. Перенесите лизаты (~600 мкл) на спин-колонок и центрифугируйте в течение 3 мин при 8 000 x g.  
Если какие-либо лизаты не полностью проходят через мембрану, повторить центрифугирование при более высоких значениях g (15 000 -20 000 x g в течение 1 мин).
2. Поместите спин-колонок в новые пробирки для сбора объемом 2 мл и выбросите пробирки с фильтратом из предыдущего шага.

### Промывание колонок

1. Добавьте 400 мкл ( $\pm$  10 мкл) раствора для промывания 1 (W1) в спин-колонок и центрифугируйте в течение 30 секунд при 11 000 x g.
2. Поместите спин-колонок в новые пробирки для сбора объемом 2 мл и выбросите пробирки с фильтратом из предыдущего шага.
3. Добавьте 400 мкл ( $\pm$  10 мкл) раствора для промывания 2 (W2) с концентрацией 1X в спин-колонок и центрифугируйте в течение 30 секунд при 11 000 x g.
4. Поместите спин-колонок в новые пробирки для сбора объемом 2 мл и выбросите пробирки с фильтратом из предыдущего шага.
5. Добавьте 200 мкл ( $\pm$  5 мкл) раствора для промывания 2 (W2) с концентрацией 1X в спин-колонок и центрифугируйте в течение 2 минут на полной скорости или при 20 000 x g.
6. Поместите спин-колонок в чистые флаконы для сбора объемом 1,5 мл (для элюирования) и выбросите пробирки с фильтратом из предыдущего шага.

### Элюирование нуклеиновых кислот

1. Добавьте в спин-колонок 50 мкл ( $\pm$  5 мкл) воды для элюирования (предварительно нагрейте до 70 °С).
2. Выдержите в течение примерно 1 мин при температуре 18–26 °С.
3. Центрифугируйте в течение 1 мин на полной скорости или при 20 000 x g для элюирования нуклеиновой кислоты из колонки.
4. Выбросьте спин-колонок и сохраните флакон для сбора объемом 1,5 мл, содержащий элюированную нуклеиновую кислоту.
5. Храните очищенную нуклеиновую кислоту при температуре 2–8 °С для использования в течение 6 часов, при температуре от -25 °С до -15 °С - в течение 1 месяца или при -80 °С для длительного хранения.

## Информация для заказа

| Продукт                                 | Код      | Объем |
|---|----------|-------|
| Буфер для лизиса тканей RealPCR (TL-60) | 99-56107 | 60 мл |

## Информация по безопасности

Следующие компоненты наборов для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR с применением спин-колонок содержат опасные ингредиенты. Надевайте перчатки и защитные очки и следуйте инструкциям по безопасности, приведенным в этом разделе.

## Классификация GHS

| Компонент                     | Опасные вещества   |   | Символ GHS     | Фразы опасности | Фразы предосторожности                                     |
|-------------------------------|--|---|----------------|-----------------|--|
| Лизирующий буфер (ЛБ)         | Гуанидина гидрохлорид 50–66%<br>Гуанидина гидрохлорид 55–66%   |  | Предупреждение | 302, 315, 319   | 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 330, 332+313, 337+313  |
| Раствор для промывания 1 (W1) | Гидрохлорид гуанидина 36–50% + изопропанол 20–50%<br>Гидрохлорид гуанидина 36–50% + изопропанол 20–50% |  | Предупреждение | 226, 302, 319   | 210, 233, 280, 301+312, 305+351+338, 330, 337+313, 403+235 |
| Жидкая ПК                     | Протеиназа К (10-100%)   |  | Опасность      | 317             |  |

### Фразы опасности

H 226 Легковоспламеняющаяся жидкость и пары.  
H 302 Вредно при проглатывании.  
H 315 Вызывает раздражение кожи  
H 317 Может вызвать аллергическую реакцию кожи.  
H 319 Вызывает серьезное раздражение глаз.

### Фразы предосторожности











P 210 Беречь от тепла, горячих поверхностей, искр, открытого огня и других источников возгорания.  
P 233 Хранить контейнер плотно закрытым.  
P 280 Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз.  
P 301+312 ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР / врачу /... / при плохом самочувствии.  
P 302+352 ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды/...  
P 305+351 ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Непрерывно промывать глаза водой в течение нескольких минут.  
+338 Снимите контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать и продолжите промывание.  
P 330 Прополоскайте рот.  
P 332 + 313 - При возникновении раздражения кожи: Обратиться к врачу.  
P 337 + 313 Если раздражение глаз не проходит, обратиться за медицинской помощью.  
P 403 + 235 Хранить в хорошо проветриваемом месте. Хранить в прохладном месте.

Для получения дополнительной информации см. Паспорта безопасности материалов.

**Для использования только в исследовательских целях.**

©2017 IDEXX Laboratories, Inc. Все права защищены.

## Условные обозначения

|   |   |
|---|---|
|    | Код серии (партии)                                    |
|    | Серийный номер  |
|    | Номер по каталогу                                     |
|    | Уполномоченный представитель в Европейском сообществе |
|    | Срок годности   |
|    | Дата изготовления                                     |
|    | Изготовитель  |
|    | Ограничение температуры                               |
|    | См. инструкцию по применению                          |
|  | Существенное изменение в инструкции пользователя      |

IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive  
Уэстбрук, Мэн 04092  
США

Изготовитель  
IDEXX Montpellier SAS  
326 rue de la Galéra  
34090 Монпелье  
Франция

Представитель в ЕС  
IDEXX Europe B.V.  
П/Я 1334  
2130 LR Хофддорп  
Нидерланды

[idexx.com](http://idexx.com)

**IDEXX**

## Руководство по организации и деkontаминации лаборатории

### Организация лаборатории

OPTI\* Medical Systems рекомендует выделить 3–4 помещения для проведения анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР):

- Помещение для экстракции: отдельное помещение среднего размера с лабораторным столом для процедуры экстракции
- Чистое помещение: небольшое отдельное помещение только для приготовления реактивов; минимальное необходимое пространство лабораторного стола; рекомендуется вытяжной шкаф
- Зона для приготовления образцов: либо отдельное помещение, либо зона с вытяжным шкафом в основной лаборатории.
- Помещение для проведения анализа: остальная часть лабораторного пространства. Важно: Лабораторное оборудование для каждого помещения должно оставаться предназначенным для этого помещения. Риск контаминации увеличивается, когда реакционные смеси приготавливаются в непосредственной близости от места экстракции нуклеиновых кислот или работы с образцами.

### Ложноположительные результаты

Реактивы для ПЦР чрезвычайно чувствительны к присутствию нуклеиновых кислот. Любая контаминация может легко привести к ложноположительному результату. Возможные причины ложноположительных результатов многочисленны:

- перекрестная контаминация при отборе образцов, между образцами или в лаборатории
- контаминация ПРЦ-реактивов или анализаторов
- перекрестные реакции с другими организмами

### Советы по предотвращению контаминации

Ниже приведены рекомендации по контролю контаминации:

- Соблюдайте правильную технику пипетирования; избегайте образования аэрозолей.
- Выделите отдельные лабораторные зоны и оборудование для приготовления смесей для ПЦР и добавления образцов.
- Контролируйте рабочий поток персонала, чтобы свести к минимуму перенос загрязнений в чистые помещения работы со смесями для ПЦР.
- Утилизируйте использованные реакционные планшеты в емкости, расположенные в зоне, находящейся вдали от чистого помещения для ПЦР.
- Используйте отдельные лабораторные халаты для разных рабочих зон.



### Процедура мониторинга лабораторной контаминации

Мониторинг лабораторной контаминации - это процедура на основе мазка для обнаружения присутствия контаминации нуклеиновыми кислотами на лабораторных поверхностях, оборудовании или в окружающей среде. Частота мониторинга лабораторной контаминации (еженедельно или ежемесячно) должна быть пропорциональной объему выполняемых ПЦР-тестов. Образцы для лабораторного мониторинга следует анализировать со всеми детекционными смесями, используемыми в диагностической лаборатории, выполняющей ПЦР в режиме реального времени. Чтобы свести к минимуму риск контаминации во время лабораторного мониторинга, положительный образец-мишень не включается.

### Порядок взятия мазков из рабочей зоны

1. Используйте один ватный тампон для каждого рабочего места, которое нужно проверить на контаминацию.
2. Кратковременно окуните каждый тампон в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую примерно 300 мкл воды для ПЦР. Удалите излишки воды с тампона, прижав его кончик к стенке пробирки. Проведите тампоном примерно по 30 см рабочей поверхности 2–3 раза, вращая его.
3. Поместите кончик обратно в пробирку и энергично поворачивайте в течение 10–15 секунд, чтобы экстрагировать захваченную нуклеиновую кислоту на тампоне.
4. Удалите воду из тампона, прижав кончик к стенке пробирки; выбросьте тампон и используйте оставшуюся жидкость в качестве образца для каждой анализируемой детекционной смеси для ПЦР.

### Процедура деконтаминации

Если в ходе процедуры лабораторного мониторинга обнаружена контаминация нуклеиновой кислотой (на что указывает положительное значение Ct для тестовой мишени), следует провести деконтаминацию помещения.

Выполните следующие действия для деконтаминации и проведите повторное тестирование:

1. Для каждого участка лаборатории с положительным результатом используйте соответствующий реактив для деконтаминации, такой как 10% раствор отбеливателя (~0,5%-ный раствор гипохлорита натрия), DNA AWAY\*, DNAzap\* или аналогичный, для фрагментации контаминирующей нуклеиновой кислоты. Распылите достаточно жидкости, чтобы смочить всю поверхность.  
  
Примечание: Гипохлорит натрия со временем быстро разлагается. Для обеспечения максимальной эффективности каждые 2–4 недели готовьте новый раствор для деконтаминации, используя дистиллированную или деионизированную воду.
2. Оставьте раствор минимум на 5 минут.
3. Очистите контаминированную область, вытерев ее бумажными полотенцами и дважды промыв деионизированной водой. Важное замечание: Гипохлорит натрия может вступать в реакцию при контакте с некоторыми компонентами наборов для экстракции нуклеиновых кислот. Поэтому важно тщательно промыть поверхности.
4. Проведите повторный анализ деконтаминированного участка(ов) в соответствии с процедурой лабораторного мониторинга с использованием детекционных смесей, давших положительный результат в первом подходе мониторинга лабораторной контаминации. Включите смесь ДНК для проверки сигналов RealPCR в качестве контроля для подтверждения положительной реакции ПЦР.
5. Запишите результаты в трекинг-файл программы мониторинга лабораторной контаминации.
6. Если результат анализа участка на наличие патогена продолжает оставаться положительным, повторите процедуру деконтаминации и выполните повторный анализ.

## Экстракция РНК вируса птичьего гриппа при помощи набора для обнаружения ДНК/РНК методом RealPCR с применением спин-колонок

### Приготовление реактивов:

- Восстановление лиофилизированной РНК-носителя (РНК): Добавить 300 мкл воды для элюирования (H<sub>2</sub>O) во флакон с РНК-носителем.
- Восстановление дополнительного внутреннего положительного контроля RealPCR (ВПК ≥ в.1.0): Добавить 500 мкл воды для ПЦР. Выдержать в течение не менее 10 мин при температуре от 18 °С до 26 °С. Перед использованием перемешать и микроцентрифугировать в течение непродолжительного времени.
- Раствор 2 для промывания с концентрацией 1x (W2): Добавить 48 мл 96-100% этанола во флакон, содержащий Раствор 2 для промывания с концентрацией 5x.
- Вода для элюирования (H<sub>2</sub>O - 50 мкл/колонка): Перед элюированием нуклеиновой кислоты нагреть до температуры 70 °С ± 5 °С.

### Приготовление образца:

Образцы мазка из трахеи: Элюировать мазки в 400-500 мкл фосфатного буфера. Для экстракции ДНК использовать 200 мкл (± 5 мкл) раствора для пропитывания тампонов.

### Протокол экстракции ДНК:

#### **I. Лизис**

1. Приготовить рабочий раствор для лизиса:

Рассчитать объем, достаточный для количества приготовленных образцов, плюс 2 дополнительных объема («мертвый объем»).

Приготовить рабочий раствор, **смешав реактивы в указанном ниже порядке.**

| Реактивы               | Объем на образец (мкл) | Количество образцов + отрицательный контроль для экстракции | Требуемый объем (мкл) |
|------------------------|------------------------|---|-----------------------|
| Лизирующий буфер (ЛБ): | 190                    | x   |                       |
| РНК-носитель (РНК)     | 5                      | x   |                       |
| Протеиназа К (ПК)      | 5                      | x   |                       |
| ВПК (дополнительно)    | 2                      | x   |                       |

Тщательно перемешать путем осторожного переворачивания. Перед использованием хранить при температуре 18–26 °С в течение не более 1 часа.

2. Поместить **200 мкл ( $\pm 5$  мкл) рабочего раствора для лизиса** в пробирку для сбора каждого образца объемом 1,5 мл.
3. Добавить **200 мкл ( $\pm 5$  мкл) образца**.
4. Перемешать путем встряхивания или при помощи дозатора.
5. Выдержать в течение **3 мин при комнатной температуре** (центрифугировать в течение непродолжительного времени для осаждения содержимого).

## II. Корректирование условий для связывания

1. Добавить **200 мкл ( $\pm 5$  мкл) этанола (96-100%)** в каждую пробирку для сбора объемом 1,5 мл.
2. Перемешать путем встряхивания (около 10 сек).
3. Выдержать в течение около **5 мин при комнатной температуре** (центрифугировать в течение непродолжительного времени для осаждения содержимого).

## III. Связывание нуклеиновых кислот

1. **Перенести лизаты (600 мкл)** на спин-колонок и центрифугировать в течение **3 мин при 8000 x g**.

*Если какие-либо лизаты не полностью проходят через мембрану, повторить центрифугирование при более высоких значениях g (15 000-20 000 x g в течение 1 мин).*

2. Поместить спин-колонок в новые пробирки для сбора объемом 2 мл и выбросить пробирки с фильтратом из предыдущего шага.

## IV. Промывание колонок

1. Добавить **400 мкл ( $\pm 10$  мкл) раствора для промывания 1 (W1)** в спин-колонок и центрифугировать в течение **30 секунд при 11000 x g**.
2. Поместить спин-колонок в новые пробирки для сбора объемом 2 мл и выбросить пробирки с фильтратом из предыдущего шага.
3. Добавить **400 мкл ( $\pm 10$  мкл) раствора для промывания 2 (W2)** в спин-колонок и центрифугировать в течение **30 секунд при 11000 x g**.
4. Поместить спин-колонок в новые пробирки для сбора объемом 2 мл и выбросить пробирки с фильтратом из предыдущего шага.
5. Добавить **200 мкл ( $\pm 5$  мкл) раствора для промывания 2 (W2)** в спин-колонок и центрифугировать в течение **2 минут на полной скорости или при 20000 x g**.
6. Поместить спин-колонок в чистые пробирки для сбора объемом 1,5 мл и выбросить пробирки с фильтратом из предыдущего шага.

## V. Элюирование нуклеиновых кислот

1. Добавить в спин-колонки **50 мкл ( $\pm$  5 мкл) воды для элюирования** (предварительно нагретой до 70 °С).
2. Выдержать в течение примерно **1 мин при комнатной температуре**.
3. Центрифугировать в течение **1 мин на полной скорости или при 20 000 x g** для элюирования нуклеиновой кислоты из колонки.
4. Выбросить спин-колонку и оставить пробирку для сбора объемом 1,5 мл (содержащую элюированную ДНК).
5. Хранить очищенную ДНК при температуре 2–8 °С для использования в течение 6 часов, при температуре –25–15 °С - в течение 1 месяца или при –80 °С для длительного хранения.

## Отчет об эксплуатационных характеристиках

- I. Общая информация
- II. Глоссарий терминов
- III. Материалы и методы
- IV. Испытания эксплуатационных характеристик

## I. Общая информация

Смесь для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR (смесь РНК ВГА) содержит праймеры и зонды для обнаружения высококонсервативной области РНК вируса гриппа А (ВГА) путем амплификации с помощью РНК мастер-микса RealPCR\* (RNA MMx). Анализ представляет собой полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) в одной пробирке. Внутренним контролем для анализа является внутренний положительный контроль RealPCR\* (ВПК ≥ версии 1.1). ВПК содержит синтетическую ДНК, которая амплифицируется с помощью праймеров и зондов, включенных в смесь для определения РНК ВГА (IAV RNA Mix).

В данном отчете резюмируются исследования, проведенные IDEXX для оценки эффективности смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А при использовании с мастер-миксом RealPCR RNA Master Mix для идентификации РНК вируса гриппа А в синтетических мишенях или клинических образцах.

**Таблица 1.** Смесь для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR\* - информация о продукте

| Код      | Количество единиц |
|----------|-------------------|
| 99-56200 | 100 реакций       |

**Примечание:** Дата публикации отчета об эксплуатационных характеристиках: Ноябрь 2017 г.

## II. Глоссарий терминов

Следующие определения взяты из раздела «Глоссарий терминов» *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных* (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2012 г.) и могут использоваться для описания рабочих характеристик анализа в данном отчете о валидации.

**Сходимость** - уровень согласия между повторениями образца как в пределах одного прогона, так и между прогонами одного и того же метода испытаний в данной лаборатории.

**Воспроизводимость** - способность метода испытаний обеспечивать согласованные результаты при применении к аликвотам одного и того же образца, испытанным одним и тем же методом в разных лабораториях.

**Чувствительность (аналитическая)** - синоним «предела обнаружения» - наименьшее обнаруживаемое количество аналита, которое может быть измерено с определенной достоверностью; аналит может включать антитела, антигены, нуклеиновые кислоты или живые организмы.

**Специфичность (аналитическая)** - степень, в которой анализ различает целевой аналит и другие компоненты в матрице образца; чем выше аналитическая специфичность, тем ниже уровень ложноположительных результатов.

### III. Материалы и методы

#### А: Реактивы и стандартный протокол испытаний

Обобщенные в данном отчете исследования были выполнены с использованием смеси IAV RNA Mix и RNA MMx в реакциях ПЦР в режиме реального времени. Планшеты обрабатывали реакционной смесью, состоящей из 10 мкл смеси IAV RNA Mix и 10 мкл РНК MMx на лунку, в которую добавляли 5 мкл образца.

#### В. ПЦР-анализаторы

В исследованиях, включенных в данный отчет, использовались следующие модели ПЦР-анализаторов:

- Applied Biosystems\* 7500
- Applied Biosystems\* ViiA\* 7
- Agilent Mx3000P\*
- Agilent Mx3005P\*
- Agilent AriaMx\*
- Bio-Rad CFX96 Touch\*
- Roche LightCycler\* 480
- QIAGEN\* Rotor-Gene

Анализаторы были запрограммированы с настройками репортера/гасителя и протоколом циклирования, показанными в таблицах 2a и 2b.

**Таблица 2a.** Настройки ПЦР-анализатора, используемые для исследования данных эксплуатационных характеристик

|   | Репортер   | Гаситель   |
|---|------------|------------|
| ВГА                                     | FAM*       | ВНQ* (нет) |
| Внутренний положительный контроль (ВПК) | HEX* (VIC) | ВНQ* (нет) |
| Пассивный стандарт                      | ROX*       | Н/П        |

**Таблица 2b.** Протокол циклирования для ПЦР-анализатора, используемый для исследования данных эксплуатационных характеристик

| Этап                       | Температура    | Время            | Количество циклов |
|----------------------------|----------------|------------------|-------------------|
| Обратная транскрипция (ОТ) | 50 °C          | 15 мин           | 1                 |
| Денатурация                | 95 °C          | 1 мин            | 1                 |
| Амплификация‡              | 95 °C<br>60 °C | 15 сек<br>30 сек | 45                |

‡Анализатор был настроен на регистрацию флуоресценции после этапа амплификации при температуре 60 °C.



### С. Приготовление образцов

Образцы, использованные в следующих исследованиях, обрабатывали одним из следующих коммерческих методов экстракции РНК:

- Экстракция магнитными частицами:
  - Набор для обнаружения РНК/ДНК патогенов MagMAX\* (Thermo Fisher)
  - Набор для выделения вирусной ДНК MagMAX\*-96 (Thermo Fisher)
  - Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR\* с применением магнитных частиц (IDEXX)
- Экстракция с применением спин-колонок:
  - Набор QIAamp\* *cador*\* Pathogen Mini (QIAGEN)
  - Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR\* с применением спин-колонок

## IV. Испытания эксплуатационных характеристик

### А: Аналитическая специфичность

**Цель:** Продемонстрировать с помощью анализа *in silico* и испытания исключительности конкретных РНК-мишеней специфичность смеси RealPCR для экстракции РНК вируса гриппа А, чтобы исключить обнаружение РНК организмов, тесно связанных с гриппом А.

#### 1. Анализ *in silico*

**Процедура:** Чтобы продемонстрировать специфичность конструкции, последовательности праймеров и зондов, использованные в анализе, сравнивали с использованием стандартного анализа BLAST\* (программа для обнаружения сходства последовательностей белков путем их локального выравнивания) с базой данных нуклеотидов nr/nt Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Параметры BLAST были настроены так, чтобы исключить любые совпадения с гриппом А и, таким образом, давать результаты только последовательностей за пределами вируса гриппа А, подобных целевому ампликону.

**Результаты/выводы:** Результаты анализа BLAST не дали совпадений. Этот анализ *in silico* подтверждает специфичность смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А для выявления исключительно вируса гриппа А.

#### 2. Испытание экспериментальной эксклюзивности

**Процедура:** Оценить специфичность ПЦР для определения вируса гриппа А путем анализа группы не гриппозных организмов, имеющих общие экологические ниши, клинические симптомы или генетическую близость. Все образцы были проанализированы с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе [Материалы и методы](#). Перечень проанализированных организмов содержится в таблице 3.

**Результаты/выводы:** Результаты экспериментальной эксклюзивности представлены в таблице 3. Не было обнаружено неспецифической амплификации с применением смеси для определения РНК ВГА.

**Таблица 3.** Эксклюзивность смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А

| <b>Организм</b>                      | <b>РНК вируса гриппа А<br/>методом RealPCR</b> |
|--------------------------------------|--|
| <i>Mycoplasma gallisepticum</i>      | Отрицательный                                  |
| <i>Mycoplasma synoviae</i>           | Отрицательный                                  |
| <i>Pasteurella multocida</i>         | Отрицательный                                  |
| Коронавирус свиней типа 2            | Отрицательный                                  |
| Дельтакоронавирус свиней             | Отрицательный                                  |
| PPCS‡, европейский штамм             | Отрицательный                                  |
| Вирус трансмиссивного гастроэнтерита | Отрицательный                                  |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>         | Отрицательный                                  |

‡ Респираторно-репродуктивный синдром свиней

### 3. Инклюзивность - анализ *in silico*

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Цель:</b>              | Продемонстрировать специфичность к вирусу гриппа А посредством анализа <i>in silico</i> гомологии последовательности праймера и зонда с высококонсервативной областью.   |
| <b>Процедура:</b>         | Чтобы продемонстрировать инклюзивность конструкции, последовательности ампликонов, использованные в анализе, сравнивали с использованием стандартного анализа BLAST с базой данных нуклеотидов NCBI nr/nt. Кроме того, были загружены и выровнены последовательности из <a href="#">Базы данных исследований гриппа</a> . Смесь RealPCR для определения РНК вируса гриппа А анализировали на совпадения выравниванию.                            |
| <b>Результаты/выводы:</b> | Анализ BLAST показал максимум 20 000 совпадений, соответствующих целевой области РНК вируса гриппа RealPCR, причем все совпадения были помечены как грипп А. Кроме того, целевая область РНК вируса гриппа А RealPCR совпадает с более чем 98% последовательностей из Базы данных исследований гриппа. Эти анализы <i>in silico</i> демонстрируют высокую инклюзивность смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А к РНК вируса гриппа А. |

### 4. Инклюзивность - экспериментальные испытания

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Цель:</b>              | Продемонстрировать посредством экспериментальных испытаний инклюзивность смеси для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR в отношении гриппа А.   |
| <b>Процедура:</b>         | РНК получали из образцов, представляющих H1-7, H10, H11 и N1-5 и N7-9. Эти экстракты РНК были проанализированы с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и стандартного протокола, описанного в разделе <a href="#">Материалы и методы</a> .  |
| <b>Результаты/выводы:</b> | Результаты экспериментальных испытаний на инклюзивность смеси для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR представлены в таблице 4. Все проанализированные подтипы Н и N были положительными, демонстрируя, что смесь для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR выявляет широкий спектр подтипов гриппа А. Это испытание согласуется с результатами анализа <i>in silico</i> . |

**Таблица 4.** Инклюзивность смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А

| RealPCR<br>Подтип | Ct ВГА |
|-------------------|--------|
| H4N2              | 15,3   |
| H1N2              | 14,8   |
| H6N2              | 17,8   |
| H6N2              | 14,7   |
| H6N4              | 14,4   |
| H2N3              | 15,5   |
| H10N7             | 13,9   |
| H3N8              | 15,4   |
| H6N8              | 16,6   |
| H10N7             | 13,7   |
| H10N7             | 13,9   |
| H2N8              | 16,9   |
| H11N9             | 14,9   |
| H1N2              | 15,0   |
| H6N2              | 16,9   |
| H1N1              | 14,7   |
| H1N1              | 14,7   |

| RealPCR<br>Подтип | Ct ВГА |
|-------------------|--------|
| H4N2              | 15,3   |
| H1N2              | 14,8   |
| H6N2              | 17,8   |
| H6N2              | 14,7   |
| H6N4              | 14,4   |
| H2N3              | 15,5   |
| H10N7             | 13,9   |
| H3N8              | 15,4   |
| H6N8              | 16,6   |
| H10N7             | 13,7   |
| H10N7             | 13,9   |
| H2N8              | 16,9   |
| H11N9             | 14,9   |
| H1N2              | 15,0   |
| H6N2              | 16,9   |
| H1N1              | 14,7   |
| H1N1              | 14,7   |

## В. Аналитическая чувствительность (ПОпцр)

**Цель:** Определить наименьшее количество нуклеиновых кислот-мишеней на реакцию, которая даст положительный результат в 95% случаев.

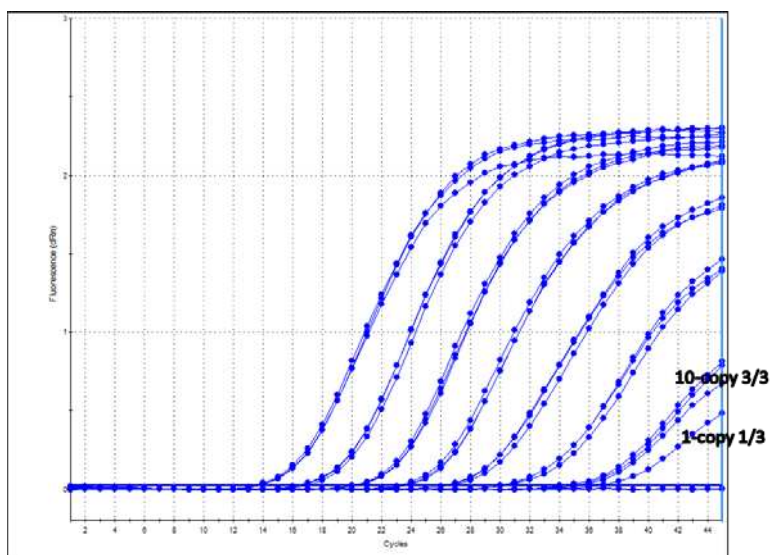
**Процедура:** Синтетическую последовательность РНК вируса гриппа А разводили в стандартном буфере. Готовили десятикратные серийные разведения, пока цель не достигла 10 копий на реакцию. Все образцы анализировали с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе [Материалы и методы](#). Каждый образец анализировали в трех повторностях; по крайней мере, две из трех повторностей должны были иметь кривые амплификации, чтобы считать результат положительным.

**Результаты/выводы:** Результаты представлены в таблице 5 ниже, а кривые амплификации показаны на рисунке 1. Мишень гриппа А выявлялась в 3/3 повторностях при концентрации, составляющей 10 копий на реакцию.

**Таблица 5.** Определение РНК вируса гриппа А методом RealPCR\*

Аналитическая чувствительность смеси

| Копий на реакцию | FAM РНК ВГА канал   |                                      |
|------------------|---------------------|--------------------------------------|
|                  | Среднее значение Ct | Количество определенных повторностей |
| 10 000 000       | 13,7                | 3/3                                  |
| 1 000 000        | 16,7                | 3/3                                  |
| 100 000          | 20,3                | 3/3                                  |
| 10 000           | 23,5                | 3/3                                  |
| 1 000            | 26,5                | 3/3                                  |
| 100              | 30,2                | 3/3                                  |
| 10               | 34,9                | 3/3                                  |
| 1                | 36,8                | 1/3                                  |



**Рисунок 1.** Кривые амплификации РНК вируса гриппа А

### С. Полевые образцы

**Цель:** Оценить смесь для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR при использовании для идентификации РНК гриппа А в полевых образцах.

**Процедура:** Испытания проводили на образцах, полученных от свиней и птиц в США. Типы образцов, включенные в множества, включали отдельные мазки из полости носа свиней, жидкости из ротовой полости свиней (смеси от 30 свиней), ткань легких свиней (отдельные свиньи), а также мазки из трахеи и клоаки птиц (отдельные мазки от индеек, уток и куликов). Наличие в образцах вируса гриппа А было подтверждено с использованием комбинации коммерческих наборов для ПЦР и/или выделением вируса. Экстракцию РНК проводили, как описано в разделе [Приготовление образцов](#). После экстракции образцы анализировали с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе [Материалы и методы](#). Таким образом, в общей сложности было проанализировано 178 подтвержденных ВГА-положительных и 163 ВГА-отрицательных образцов.

**Результаты/выводы:** Сводные результаты по эффективности смеси для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR представлены в таблице 5. В множестве из 341 образца было четыре ложноотрицательных образца и один ложноположительный образец.

**Таблица 5.** Эффективность смеси для определения РНК вируса гриппа А на полевых образцах

|  |               | Подтвержденный статус |               |
|--|---------------|-----------------------|---------------|
|  |               | Положительный         | Отрицательный |
| РНК вируса гриппа А<br>методом RealPCR | Положительный | 174                   | 1             |
|  | Отрицательный | 4                     | 162           |

## D. Объединенные образцы

### 1. Мазки от птиц

**Цель:** Оценить смесь для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR при использовании для анализа объединенных образцов, содержащих до 11 мазков от птиц.

**Процедура:** Было приготовлено десять пулов мазков из клоаки и трахеи птиц с одним ВГА-положительным образцом и десятью ВГА-отрицательными образцами на пул. Экстракцию РНК проводили, как описано в разделе [Приготовление образцов](#). Отдельные и объединенные образцы анализировали с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе [Материалы и методы](#).

**Результаты/выводы:** Результаты представлены в Таблице 6. РНК вируса гриппа А была обнаружена в каждом отдельном положительном образце, но один пул оказался отрицательным. Как и в случае с любой другой тест-системой, на способность обнаруживать слабоположительные образцы влияет эффект разведения при объединении.

Таблица 6. ВГА-положительные образцы мазков от птиц и пулы

| Код образца | Тип образца    | Статус в отношении вируса гриппа А | Отдельные образцы | Объединенные образцы (1 положительный + 10 отрицательных) |                   |
|-------------|----------------|------------------------------------|-------------------|---|-------------------|
|             |                |                                    | Ct ВГА            | Ct ВГА  | Результат RealPCR |
| Пул 1       | Мазок от птицы | Положительный                      | 20,7              | 23,4  | Положительный     |
| Пул 2       | Мазок от птицы | Положительный                      | 30,2              | 32,7  | Положительный     |
| Пул 3       | Мазок от птицы | Положительный                      | 26,9              | 28,8  | Положительный     |
| Пул 4       | Мазок от птицы | Положительный                      | 25,9              | 27,3  | Положительный     |
| Пул 5       | Мазок от птицы | Положительный                      | 32,2              | --  | Отрицательный     |
| Пул 6       | Мазок от птицы | Положительный                      | 26,0              | 30,2  | Положительный     |
| Пул 7       | Мазок от птицы | Положительный                      | 18,0              | 21,4  | Положительный     |
| Пул 9       | Мазок от птицы | Положительный                      | 27,4              | 30,6  | Положительный     |
| Пул 10      | Мазок от птицы | Положительный                      | 35,5              | 40,5  | Положительный     |



## 2. Пулы образцов из легких свиней

**Цель:** Оценить смесь для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR при использовании для анализа объединенных образцов, содержащих до 5 образцов легких свиней.

**Процедура:** Было приготовлено пять пулов образцов легких свиней с использованием одного ВГА-положительного образца и четырех ВГА-отрицательных образцов на пул. Экстракцию РНК проводили, как описано в разделе [Приготовление образцов](#). Отдельные и объединенные образцы анализировали с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе [Материалы и методы](#).

**Результаты/выводы:** Результаты представлены в Таблице 7. РНК вируса гриппа А была обнаружена в каждом отдельном положительном образце и во всех пяти пулах.

Таблица 7. ВГА-положительные образцы легких свиней и пулы

| Код образца | Тип образца   | Статус в отношении вируса гриппа А | Отдельные образцы | Объединенные образцы (1 положительный + 4 отрицательных) |                   |
|-------------|---------------|------------------------------------|-------------------|--|-------------------|
|             |               |                                    | Ct ВГА            | Ct ВГА   | Результат RealPCR |
| Пул 1       | Легкое свиньи | Положительный                      | 25,3              | 27,7   | Положительный     |
| Пул 2       | Легкое свиньи | Положительный                      | 22,9              | 26,4   | Положительный     |
| Пул 3       | Легкое свиньи | Положительный                      | 29,0              | 32,3   | Положительный     |
| Пул 4       | Легкое свиньи | Положительный                      | 23,8              | 29,1   | Положительный     |
| Пул 5       | Легкое свиньи | Положительный                      | 29,9              | 36,0   | Положительный     |

### 3. Пулы образцов мазков из полости носа свиней

**Цель:** Оценить смесь для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR при использовании для анализа объединенных образцов, содержащих до 10 мазков из полости носа свиней.

**Процедура:** Было приготовлено пять пулов мазков из полости носа свиней с использованием одного ВГА-положительного образца и девяти ВГА-отрицательных образцов на пул. Экстракцию РНК проводили, как описано в разделе [Приготовление образцов](#). Отдельные и объединенные образцы анализировали с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе [Материалы и методы](#).

**Результаты/выводы:** Результаты представлены в Таблице 8. РНК вируса гриппа А была обнаружена в каждом отдельном положительном образце и во всех пяти пулах.

Таблица 8. ВГА-положительные образцы мазков из полости носа свиней и пулы

| Код образца | Тип образца                  | Статус в отношении вируса гриппа А | Отдельные образцы | Объединенные образцы (1 положительный + 9 отрицательных) |                   |
|-------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------|--|-------------------|
|             |                              |                                    | Ct ВГА            | Ct ВГА   | Результат RealPCR |
| Пул 1       | Мазок из полости носа свиней | Положительный                      | 25,0              | 29,4   | Положительный     |
| Пул 2       | Мазок из полости носа свиней | Положительный                      | 35,5              | --   | Отрицательный     |
| Пул 3       | Мазок из полости носа свиней | Положительный                      | 27,5              | 29,0   | Положительный     |
| Пул 4       | Мазок из полости носа свиней | Положительный                      | 17,6              | 21,3   | Положительный     |
| Пул 5       | Мазок из полости носа свиней | Положительный                      | 28,3              | 33,4   | Положительный     |

## Е. Сходимость

- Цель:** Продемонстрировать уровень согласия между повторностями образца в пределах одного испытания и между последовательными испытаниями с использованием смеси для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR при постоянных условиях (оператор, лаборатория и анализатор).
- Процедура:** Высокий, средний и низкий уровни синтетической РНК-мишени гриппа А анализировал в трех повторностях один и тот же оператор с использованием тех же партий реактивов и ПЦР-анализатора для трех испытаний. Все образцы анализировали с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе Материалы и методы данного документа (стр. 3). Анализ повторяли в трех независимых испытаниях и рассчитывали коэффициент вариабельности (% КВ) на основе девяти значений Ct вируса гриппа А (FAM\*) для каждого образца в качестве меры сходимости.
- Результаты/выводы:** Результаты представлены в Таблице 9. Для всех трех проанализированных целевых уровней значения КВ% между прогонами (между анализами) составляли менее 4%, а значения в пределах прогона (между лунками) для наборов высокого и среднего уровня составляли менее 3,6%. %КВ образца с низким уровнем в пределах прогона был повышен из-за значения «нет Ct» в третьем прогоне, что было связано с анализом образца вблизи пределу обнаружения смеси. Это демонстрирует высокую сходимость результатов с применением смеси для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR.

Таблица 9. Сходимость значений Ct РНК вируса гриппа А

|                 |          | Значения Ct вируса гриппа А (FAM) |          |          | Среднее значение Ct | %КВ между прогонами | %КВ в пределах прогона |
|-----------------|----------|-----------------------------------|----------|----------|---------------------|---------------------|------------------------|
|                 |          | 1 прогон                          | 2 прогон | 3 прогон |                     |                     |                        |
| Низкий уровень  | Повтор 1 | 35,1                              | 34,4     | 37,2     | 35,7                | 3,5%                | 8,2%                   |
|                 | Повтор 2 | 35,0                              | 35,6     | Нет Ct   |                     |                     |                        |
|                 | Повтор 3 | 37,2                              | 35,9     | 35,6     |                     |                     |                        |
| Средний уровень | Повтор 1 | 29,5                              | 31,8     | 33,1     | 31,6                | 3,8%                | 2,1%                   |
|                 | Повтор 2 | 29,8                              | 32,7     | 31,8     |                     |                     |                        |
|                 | Повтор 3 | 31,0                              | 32,2     | 32,1     |                     |                     |                        |
| Высокий уровень | Повтор 1 | 27,3                              | 26,2     | 27,9     | 26,9                | 2,4%                | 3,6%                   |
|                 | Повтор 2 | 24,6                              | 27,9     | 28,0     |                     |                     |                        |
|                 | Повтор 3 | 26,0                              | 26,8     | 27,1     |                     |                     |                        |

## Ф. Воспроизводимость/сравнение ПЦР-анализаторов

- Цель:** Продемонстрировать согласованность результатов между повторами образца в различных условиях (оператор, лаборатория и ПЦР-анализатор).
- Процедура:** Высокий, средний и низкий уровни целевого синтетического вируса гриппа А анализировали в двух повторностях три оператора в трех разных лабораториях. В исследовании воспроизводимости использовали в общей сложности восемь ПЦР-анализаторов. Все образцы анализировали с использованием смеси RealPCR для определения РНК вируса гриппа А и протокола испытаний, описанного в разделе [Материалы и методы](#). Для определения общей вариабельности повторностей рассчитывали коэффициент вариабельности (%КВ) из значений Ct ВГА(FAM).
- Результаты/выводы:** Результаты представлены в Таблице 10. Для всех проанализированных уровней синтетических мишеней рассчитанное значение % КВ составляло 4,6% –5,6%. Это исследование демонстрирует высокую сходимость результатов с применением смеси для определения РНК вируса гриппа А методом RealPCR в различных рабочих условиях.

**Таблица 10.** Значения Ct воспроизводимости ВГА

|                 |          | Agilent Mx3000P | Agilent AriaMx | ABI ViiA7     | ABI 7500 FAST | Roche LC480   | Qiagen Rotorgene | Biorad CFX96  | Agilent Mx3005P |                     |      |
|-----------------|----------|-----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|------------------|---------------|-----------------|---------------------|------|
|                 |          | Лаборатория А   | Лаборатория А  | Лаборатория А | Лаборатория А | Лаборатория А | Лаборатория А    | Лаборатория В | Лаборатория С   | Среднее значение Ct | КВ%  |
|                 |          | Оператор 1      | Оператор 1     | Оператор 1    | Оператор 2    | Оператор 1    | Оператор 1       | Оператор 2    | Оператор 3      |                     |      |
| Низкий уровень  | Повтор 1 | 30,5            | 33,1           | 35,9          | 36,0          | 34,5          | 32,7             | 34,0          | 33,5            | 34,0                | 5,6% |
|                 | Повтор 2 | 30,7            | 32,5           | 35,4          | 35,0          | 34,7          | 32,9             | 35,1          | 37,6            |                     |      |
| Средний уровень | Повтор 1 | 27,6            | 28,9           | 30,1          | 31,0          | 30,7          | 28,4             | 30,6          | 29,9            | 29,7                | 4,6% |
|                 | Повтор 2 | 27,4            | 28,7           | 30,2          | 32,4          | 30,4          | 28,3             | 30,2          | 30,6            |                     |      |
| Высокий уровень | Повтор 1 | 23,5            | 24,6           | 25,9          | 26,9          | 26,7          | 24,3             | 26,4          | 27,4            | 25,8                | 5,5% |
|                 | Повтор 2 | 23,8            | 24,5           | 25,8          | 27,9          | 26,7          | 24,3             | 26,3          | 27,5            |                     |      |

Test with Confidence™



**IDEXX Laboratories, Inc.**  
Мировая штаб-квартира  
One IDEXX Drive  
Уэстбрук, Мэн 04092  
США  
Тел.: +1 207 556 4890 или  
+1 800 548 9997  
Факс: +1 207 556 4826 или  
+1 800 328 5461

**IDEXX Europe B.V.**  
Штаб-квартира в Европе  
Scorpius 60 Building F  
2132 LR Hoofddorp  
Нидерланды  
Тел.: +31 23 558 70 00 или  
+800 727 43399  
Факс: +31 23 558 72 33

**IDEXX Laboratories, Inc.**  
Штаб-квартира в Азии  
3F-5 No. 88, Rei Hu Street  
Nei Hu District  
11494 Тайбэй  
Тайвань  
Тел.: +886 2 6603 9728  
Факс: +886 2 2658 8242

**IDEXX Brasil**  
Штаб-квартира в Бразилии  
1478 Av. Brig. Faria Lima  
Сан-Паулу, Сан-Паулу  
Бразилия  
Тел.: +55 11 3095-5632  
Факс: +55 11 3095-5641

© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. Все права защищены. • 09-80571-02-EN-L  
\*IDEXX, Test with Confidence и RealPCR являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками компании IDEXX Laboratories, Inc. или ее аффилированных компаний в США и/или других странах. LightCycler является зарегистрированной торговой маркой компании Roche Diagnostics GmbH. FAM и HEX являются торговыми марками компании Applied Biosystems или ее дочерних компаний в США и/или некоторых других странах. AriaMx, Mx3000P и Mx3005P являются торговыми марками компании Agilent Technologies, Inc. Applied Biosystems, DNAZap, MagMAX, ROX и ViiA являются торговыми марками компании Life Technologies Corporation. QIAAGEN, QIAamp, Rotor-Gene и RNeasy являются торговыми марками компании QIAAGEN Group. NucleoMag является зарегистрированной торговой маркой компании MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG. DNA AWAY является торговой маркой или зарегистрированной торговой маркой компании Thermo Fisher Scientific. Black Hole Quencher и BHQ являются торговыми марками компании Biosearch Technologies, Inc. Все остальные названия продуктов и компаний и логотипы являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками соответствующих владельцев. Политика конфиденциальности компании IDEXX доступна на сайте [idexx.com](http://idexx.com).

# Тест на определение РНК вируса гриппа А методом RealPCR\*

Только для применения в ветеринарии

## Наименование и предусмотренное применение

Тест на определение РНК вируса гриппа А методом RealPCR\* предназначен для обнаружения РНК высококонсервативного участка генома вируса гриппа А (ВГА) с использованием тест-системы IDEXX RealPCR. Тест используется для амплификации РНК, экстрагированной из пероральной жидкости свиней, назальных смывов и бронхоальвеолярного лаважа; а также РНК, экстрагированной из трахеальных смывов, ткани трахеи и клоакальных смывов птиц. Пробы из легких и носовые смывы от свиней можно объединять для исследования до пяти образцов в один пул; пероральную жидкость можно тестировать в виде объединенного образца, взятого из бокса, содержащего до 30 животных. Пробы трахеальной ткани и смывы от птицы для исследования можно объединять до 11 образцов в один пул. Тест на определение РНК вируса гриппа А методом RealPCR используется в качестве скринингового теста и не дифференцирует отдельные подтипы ВГА друг от друга.

## Общая информация

Вирус гриппа А относится к семейству вирусов *Orthomyxoviridae* и известен как высокоактивный патоген, способный инфицировать широкий круг животных, включая свиней, птиц и собак, а также человека. Вирусы гриппа А делятся на подтипы на основании двух поверхностных белков, экспрессируемых вирусом. Тяжесть течения гриппа А зависит от подтипа и/или изолята вируса.

Тест-система IDEXX RealPCR имеет модульный формат, в котором детекционные смеси, специфичные к данному заболеванию, сочетаются со стандартизированной реакционной смесью ДНК или РНК (мастер-миксом), а также единым смешанным положительным контролем. Реактивы имеют индивидуальную упаковку и продаются раздельно, что позволяет использовать их в любой комплектации.

Детекционная смесь RealPCR для определения РНК ВГА (IAV RNA Mix) содержит праймеры и зонды для выявления

РНК вируса гриппа А при амплификации с использованием РНК мастер-микса RealPCR (RNA MMx). Внутренним контролем для анализа является внутренний положительный контроль RealPCR (ВПК  $\geq$  в.1.3). ВПК содержит синтетическую РНК, которая амплифицируется с помощью праймеров и зондов, включенных в смесь для определения РНК ВГА (IAV RNA Mix).

## Материалы и хранение

| Идентификация/Общая информация  | Цвет крышки | Количество<br>100 тестов | Хранение                    |                      | Циклы замораживания/оттаивания |
|---|-------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------------|
|   |             |                          | При получении               | После восстановления |                                |
| <b>Смесь для определения РНК ВГА RealPCR (IAV RNA Mix), высушенная</b>  | Желтый      | 1 x 1,0 мл               | от -25 °С до 8 °С           | от -25 °С до -15 °С  | ≥6                             |
| Код 99-56200<br>Разведите до 1 мл при помощи воды для ПЦР. Храните смесь для определения РНК ВГА в темноте. Срок годности, указанный на флаконе, действителен как для сухой, так и для восстановленной формы. На этикетке пробирки со смесью для определения РНК ВГП указана версия положительного контроля (ПК), совместимая с этой детекционной смесью. Например, ПК ≥ в. 1.4 означает, что детекционную смесь можно использовать с версиями ПК 1.4 и выше.   |             |                          |                             |                      |                                |
| <b>Мастер-микс РНК RealPCR (RNA MMx)</b>  | Черный      | 1 x 1,0 мл               | от -25 до -15°С (длительно) | Н/П                  | <6                             |
| Код 99-56280<br>Концентрированный мастер-микс, который включает обратную транскриптазу и hot-start полимеразу для использования с РНК-детекционными смесями в системе IDEXX RealPCR. РНК MMx более вязкий, чем большинство мастер-миксов - рекомендации по работе с реактивом указаны в Процедуруе анализа. Эталонный краситель (ROX) был добавлен для нормализации неточностей объема. РНК MMx следует беречь от света.  |             |                          |                             |                      |                                |
| <b>Положительный контроль RealPCR, сухой (ПК)</b>   | Синий       | 1 x 500 мкл              | от -25 °С до 8 °С           | от -25 °С до -15 °С  | <6                             |
| Код 99-56310<br>Разведите до 500 мкл при помощи воды для ПЦР. ПК содержит все мишени IDEXX RealPCR и внутреннего контроля (включая мишень для ВГА) и предназначен для использования со всеми детекционными смесями IDEXX RealPCR. Срок годности, указанный на флаконе, действителен как для сухой, так и для восстановленной формы. У ПК есть номер версии (например, в. 1.3). Когда для линейки продуктов RealPCR разрабатываются новые детекционные смеси, к ПК добавляются последовательности-мишени, и номер версии ПК увеличивается (например, с версии 1.3 увеличивается до версии 1.4).<br>ПК включает в себя сигнатуру IDEXX (уникальную последовательность олигонуклеотидов). Присутствие сигнатуры IDEXX в рабочей среде указывает на контаминацию ПК. Лаборатории, желающие контролировать контаминацию положительным контролем, могут определять сигнатуру IDEXX с помощью смесей RealPCR PC Tracker DNA Mix и RealPCR DNA MMx. |             |                          |                             |                      |                                |
| <b>RealPCR Внутренний положительный контроль (ВПК)</b>  | Белый       | 1 x 500 мкл              | от -25 °С до 8 °С           | от -25 °С до -15 °С  | ≤6                             |
| Код 99-56330<br>Разведите до 500 мкл при помощи воды для ПЦР. ВПК содержит все мишени внутреннего контроля IDEXX RealPCR. Срок годности, указанный на флаконе, действителен как для сухой, так и для восстановленной формы. У ВПК есть номер версии (например, в. 1.3).<br>Когда для линейки продуктов RealPCR разрабатываются новые мишени внутреннего контроля, к ВПК добавляются последовательности-мишени, и номер версии ВПК увеличивается (например, с версии 1.3 увеличивается до версии 1.4).   |             |                          |                             |                      |                                |
| <b>Вода для ПЦР RealPCR</b>   | Прозрачный  | 2 x 1,0 мл               | от -25 °С до 8 °С           |                      | Н/П                            |
| Код 99-56350 Вода, пригодная для ПЦР, отвечает требованиям к использованию для ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Используется для восстановления реактивов RealPCR. Она также применяется для каждого цикла ПЦР как отрицательный контроль. Не переносите флаконы с водой для ПЦР из одной рабочей зоны в другую. Во избежание контаминации следует использовать разные флаконы с водой для разных зон.  |             |                          |                             |                      |                                |

Примечание: См. таблицу на последней странице с описаниями символов, используемых в инструкции и на этикетках.

### Необходимые материалы (не входят в комплект)

- Коммерческий набор для экстракции РНК
- Факультативно—Центрифуга с ротором и адаптерами для многоруночных планшетов.
- Микроцентрифуга для микропробирок объемом 2 мл для использования при 1500 – 3000 x g
- Подходящие средства индивидуальной защиты (такие как перчатки, халат)
- Не содержащие нуклеаз, устойчивые к аэрозолям наконечники для пипеток
- Стерильные микропробирки для приготовления ПЦР-смеси
- Дозаторы (5–1000 мкл); специально выделенные для работы с ПЦР-смесью
- 96- или 384-луночные ПЦР-планшеты и пленка для заклеивания планшета/крышки
- Анализатор для ПЦР в режиме реального времени (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® ViiA™ 7, Agilent Mx3000P™, Agilent Mx3005P™, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch™, Applied Biosystems QuantStudio 5, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, Applied Biosystems QuantStudio™ Flex, QIAGEN Rotor-Gene (только модель с 72-луночным ротором), Roche LightCycler® 480 или аналогичный).

Примечание. Для анализатора Roche LC480 требуется дополнительная калибровка и настройки программного обеспечения. Техническая поддержка IDEXX может предоставить руководство для использования этого анализатора с реактивами RealPCR.

### Лабораторные практики и предупреждения

- Не используйте реактивы с истекшим сроком годности.
- Вся работа должна проводиться в свободных от нуклеазы условиях.
- При работе с реактивами и нуклеиновыми кислотами пользуйтесь неопудренными перчатками.
- Во избежание перекрестной контаминации используйте не содержащие нуклеаз, устойчивые к аэрозолям наконечники для пипеток и физически разделите рабочие места для экстракции/обработки нуклеиновых кислот, подготовки к ПЦР и проведения ПЦР.

### Восстановление сухих компонентов

Восстановите смесь для определения РНК ВГА, внутренний положительный контроль и положительный контроль, добавив пипеткой воду для ПЦР до объема, указанного на этикетке компонента. Выдержите в течение не менее 10 мин при температуре от 18 °С до 26 °С. Перед использованием перемешайте и коротко микроцентрифугируйте. После восстановления смеси РНК ВГА, ВПК и положительного контроля разделите на аликвоты и храните растворы в замороженном виде. Работая с замороженными реактивами, сначала оставьте их для оттаивания при температуре 18-26 °С примерно на 15-30 минут, затем аккуратно перемешайте и коротко центрифугируйте (~1,500 – 3,000 × g).

### Экстракция кДНК

#### Использование ВПК RealPCR

Используйте 2 мкл восстановленного ВПК на один сеанс экстракции. Добавьте ВПК к раствору для экстракционного лизиса и действуйте согласно инструкциям по применению коммерческого набора для экстракции

Смесь РНК ВГА была валидирована с использованием коммерческих наборов для экстракции, указанных ниже. Другие методы экстракции или лизиса также могут использоваться после внутрилабораторной валидации.

#### Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR с применением спин-колонок и Набор для экстракции ДНК/РНК методом RealPCR с применением магнитных частиц

Экстракция образцов проводится согласно описанию в руководстве пользователя. Не допускается никаких отклонений от протокола.

#### Набор для экстракции РНК/ДНК патогенов MagMAX™ (Life Technologies)

Экстракцию для жидкости ротовой полости проводите согласно протоколу для образцов жидкости ротовой полости. При экстракции бронхиально-альвеолярной жидкости, элюатов трахеальных смывов и клоакальных мазков действуйте согласно протоколу для образцов с низким содержанием клеток. При работе с образцами тканей приготовьте 10% (мас/об) гомогенат, при необходимости проведите его осветление; при экстрагировании руководствуйтесь протоколом для образцов с низким содержанием клеток. Не допускается никаких отклонений от соответствующих протоколов.



## Набор QIAamp cadof Pathogen Mini (Qiagen)

При работе с образцами тканей приготовьте 10% (мас/об) гомогенат, при необходимости проведите его осветление. При экстракции из тканевых суспензий, жидкостей из ротовой полости, бронхиально-альвеолярной жидкости, элюатов трахеальных мазков и элюатов клоакальных мазков действуйте согласно протоколу для образцов жидкостей. Не допускается никаких отклонений от протокола.

Если анализ проводится не сразу же после экстракции, очищенную РНК следует хранить при температуре  $\leq -15^{\circ}\text{C}$ . Отрицательный контроль экстракции рекомендуется исследовать как образец (ложный образец).

### Процедура анализа

1 Приготовление ПЦР-микса.

- Перемешайте оттаявший мастер-микс РНК ММх переворачиванием или осторожно на вортексе.
- РНК ММх весьма вязкий; всегда пипетируйте его медленно.
- Для подготовки ПЦР-микса добавьте 10 мкл детекционного раствора РНК ВГА и 10 мкл мастер-РНК ММх для каждой реакции.
- При приготовлении ПЦР-микса сначала вносите в пробирку детекционный раствор РНК ВГА, а затем добавляйте мастер-микс РНК ММх.

Несколько раз пипетируйте вверх и вниз, чтобы смыть мастер-микс ММх с наконечника.

- Аккуратно перемешайте на вортексе. Убедитесь, что компоненты тщательно перемешаны.
- Медленно внесите ПЦР-микс на планшет для ПЦР.

Загрузите планшет для ПЦР в течение следующих 20 минут или храните его до исследования при температуре 2 до  $8^{\circ}\text{C}$  в течение до 4 часов. ПЦР-микс можно хранить при температуре от  $-25$  до  $-15^{\circ}\text{C}$  в течение до 2 недель. Беречь от света.

---

2 Внесите по 20 мкл ПЦР-микса в нужное количество лунок на планшете.

---

3 Добавьте по 5 мкл образца РНК в каждую лунку. Конечный объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

---

4 В каждый анализ включайте положительный контроль (5 мкл) и отрицательный контроль для ПЦР (5 мкл воды для ПЦР).

---

5 Накройте планшет и, при необходимости, кратковременно центрифугируйте, чтобы осадить содержимое и избавиться от пузырьков.

---

6 Запрограммируйте термоциклер в соответствии со стандартной программой циклирования ДНК/РНК IDEXX RealPCR.

---

### Настройки для репортера и гасителя

| Мишень<br>ВГА             | Репортер<br>FAM™ | Гаситель<br>ВНQ®<br>(отсутствует) |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------|
| Внутренний контроль (ВПК) | HEX™ (VIC)       | ВНQ<br>(отсутствует)              |
| Пассивный стандарт        | ROX™             | Н/П                               |

Стандартная программа циклирования ДНК/РНК RealPCR\*

|                            | Температура          | Время  | Количество циклов |
|----------------------------|----------------------|--------|-------------------|
| Обратная транскрипция (ОТ) | $50^{\circ}\text{C}$ | 15 мин | 1                 |
| Денатурация                | $95^{\circ}\text{C}$ | 1 мин  | 1                 |
| Аmplификация**             | $95^{\circ}\text{C}$ | 15 сек | 45                |
|                            | $60^{\circ}\text{C}$ | 30 сек |                   |

\*\*Убедитесь, что термоциклер настроен на регистрацию флуоресценции после этапа амплификации при температуре  $60^{\circ}\text{C}$ .

7 Проведите анализ данных. При настройке программного обеспечения аппарата присвойте уникальный идентификатор для каждой мишени и внутреннего контроля. Например, когда мишени А и В находятся на одном планшете, то лунки мишени А должны быть проанализированы независимо от лунок мишени В. Обратитесь к руководству по эксплуатации конкретного прибора для получения сведений о том, как анализировать данные. Для установки порогового значения используйте настройку Auto Ct.

- При работе с системами компании Agilent Mx3000P и Mx3005P удостоверьтесь, что для анализа используется метод фоновой пороговой флуоресценции.
- Для инструмента QIAGEN Rotor-Gene вручную установите пороговое значение выше фона в линейной фазе экспоненциальной амплификации. Лучше всего это делать на графиках просмотра журнала и требуется повторить для каждого репортера в детекционной смеси.
- Инструменты Applied Biosystems – В некоторых ситуациях автоматически установленное пороговое значение не позволяет получать удовлетворительные результаты. В таких ситуациях для определения величины Ct пороговое значение необходимо установить вручную. Лучше всего это делать на графиках просмотра журнала и требуется повторить для каждого репортера в детекционной смеси.



#### Критерии достоверности

|                            | Значение Ct FAM | Значение Ct HEX (VIC) |
|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| Положительный контроль     | <38             | <38                   |
| Отрицательный контроль ПЦР | Нет сигнала     | Нет сигнала           |

#### 8 Интерпретация результатов

| Результат анализа образца | Сигнал FAM | Сигнал HEX (VIC) (Ct) | Прочие характеристики  |
|---------------------------|------------|-----------------------|--|
| РНК ВГА-положительный     | Да         | Да/Нет                | Положительное значение Ct и характерная кривая амплификации по сравнению с отрицательным контролем ПЦР. Кривая амплификации для внутреннего контрольного образца ожидается в канале HEX (VIC); однако для некоторых резко положительных по ВГА образцов может отмечаться отрицательный результат для внутреннего контроля. † |
| РНК ВГА-отрицательный     | Нет        | <36                   | Кривая амплификации по каналу внутреннего контроля HEX (VIC).  |
| Недействительный‡         | Нет        | ≥36                   |  |

†Детекционная смесь оптимизирована для обнаружения РНК ВГА; РНК-резкоположительный образец может подавлять обнаружение внутреннего контрольного образца и привести в его отношении к отрицательному результату.

‡Недействительный результат анализа образца может указывать на неправильное добавление, экстракцию образца и/или ошибки в проведении ПЦР. Рекомендуется пятикратное разведение РНК в воде для ПЦР и проведение повторного анализа; также включите образец неразведенной РНК. Если результат по-прежнему недействителен, рекомендуется проведение новой экстракции.

**Для получения технической помощи:**

IDEXX США Тел.: +1 800 548 9997 или +1 207 556 4895

IDEXX Европа Тел. +800 727 43399

Обратитесь к региональному менеджеру или дистрибьютору IDEXX или посетите наш веб-сайт [idexx.com/contact/ptd](http://idexx.com/contact/ptd)

\*IDEXX, RealPCR и Test With Confidence являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками компании IDEXX Laboratories или ее аффилированных компаний в США и/или других странах. Все остальные названия продуктов и компаний и логотипы являются торговыми марками соответствующих владельцев.

Некоторые красители в составе данного продукта продаются по лицензии компании Biosearch Technologies, Inc. и защищены выданными или заявленными патентами США и других стран. Лицензия распространяется на применение в ветеринарии. Не предназначено для медицинской диагностики in vitro.

Информация о патенте: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2019 IDEXX Laboratories, Inc. Все права защищены.