



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
А.В. Кривонос

2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для обнаружения вируса диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в реальном времени
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения вируса диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

1.2 Тест-система состоит из 2 наборов и рассчитана на проведение 50 анализов, включая контрольные образцы (таблица 1)

Таблица 1

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I – для выделения РНК			
1	Раствор-1	18,0 мл	2 флакона
2	Раствор-2	12,0 мл	1 флакон
3	Раствор-3	12,0 мл	1 флакон
4	Сорбент	2,0 мл	1 пробирка
5	Деионизованная вода	2,0 мл	2 пробирки
Набор II - для выявления РНК вируса диареи крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени			
1	Тақ-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	MMLV-ревертаза	0,008 мл	1 пробирка
3	Внутренний контрольный образец (ВКО)	0,4 мл	2 пробирки
4	Положительный контроль ПЦР ВД	0,1 мл	1 пробирка
5	Отрицательный контроль (ОК)	0,1 мл	1 пробирка
6	ПЦР-смесь ВД	0,27 мл	1 пробирка
7	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для выявления РНК вируса диареи крупного рогатого скота в сыворотке крови, сперме, носовых и фарингеальных смывах, фекалиях, органах павших и вынужденно убитых животных - лимфоузлах, фрагментах сердца, печени, селезенки, миндалин, а также в инфицированных культурах клеток.

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл и 20 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого наименования компонента.

Наборы I и II отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. На каждый пакет с компонентами наборов наклеена этикетка с указанием организации-производителя и/или товарного знака, наименования набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения.

Набор I упакован в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены типографским способом следующие обозначения: наименование организации-производителя, полное наименование тест-системы, количество анализов, номер серии и контроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), условия хранения, обозначение СТО, знак соответствия в системе ГОСТ Р, надпись «Для ветеринарного применения». В каждую коробку вложена инструкция по применению тест-системы.

1.4 Условия хранения и транспортирования

Набор I хранить при температуре от 2°C до 25°C, Набор II – при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

Транспортирование Набора I, упакованного в картонную или пластиковую коробку, проводить при температуре от 2°C до 25°C. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка).

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления. Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии примесей и неиспользованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов необходимо проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20-24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т.

II. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1 Анализ по обнаружению вируса диареи крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени включает выделение суммарной РНК в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО), проведение реакции обратной транскрипции и амплификации специфических фрагментов методом ПЦР в реальном времени. В ходе ПЦР происходит разъединение флуоресцентных меток и гасителей, что приводит к появлению свечения, по интенсивности которого исследователь может узнать о ходе реакции в каждый момент времени.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

При выполнении исследований следует соблюдать условия и требования МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

3.1 Подготовка к работе

3.1.1 Необходимые условия для успешного проведения анализа:

- Строго соблюдать условия хранения и транспортирования компонентов тест-системы (см. п. 1.4).

- Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки применять нельзя.

- На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

- Для отбора образцов биоматериала использовать одноразовую посуду или посуду, тщательно обработанную хромовой смесью, отмытую и стерилизованную.

- Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять кратковременным центрифугированием, избегая случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

- Готовить реакционные смеси и работать с прибором для проведения ПЦР в реальном времени следует в одноразовых перчатках.

- На всех стадиях обработки биоматериала удаление надосадочной жидкости производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% раствор хлорамина или 5% раствор перекиси водорода и т. п.).

3.1.2 Необходимые материалы и оборудование

- Ламинарный бокс (класс биологической безопасности II);

- ПЦР-бокс;

- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25°C до 100°C;

- Настольная центрифуга типа «Эппендорф»;

- Встряхиватель типа «Vortex»;

- Отсасыватель медицинский вакуумный с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- Холодильник бытовой от 2°C до 8°C с морозильной камерой;
- Амплификатор типа ДТ-96 («ДНК-технология», Россия), «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research» Австралия) или аналогичные;
- Набор пипеточных дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для пипеточных дозаторов с аэрозольным барьером (фильтром) до 20 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;
- Микропробирки объемом 1,5 мл типа «Эпшендорф»;
- Микропробирки объемом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой;
- Штативы для микропробирок объемом 1,5 и 0,2 мл;
- Отдельный халат и одноразовые перчатки из латекса;
- Средства для обеззараживания и дезинфекции рабочего места.

3.1.3 Подготовка и хранение исследуемого материала

СЫВОРОТКА КРОВИ: пробы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 5 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 30 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения РНК использовать 200 мкл сыворотки крови, помещенных в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

ФЕКАЛИИ: для исследования использовать пробы фекалий массой (объемом) примерно 1-3 г (1-3 мл). Образцы хранить при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток. При исследовании фекалий без предварительного замораживания суспендировать их в фосфатном буфере или физиологическом растворе (приготовить 10-20%-ную суспензию), затем центрифугировать 2 мин при 9000 об/мин. Для выделения РНК использовать 200 мкл супернатанта, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл. При необходимости длительного хранения к 10-20%-ной фекальной суспензии добавить глицерин до конечной концентрации 10-15%, гомогенизировать, экспонировать пробу 30-40 минут и заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C. Хранить не более 7 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

СПЕРМА: пробы хранить при температуре от 2°C до 8°C не более суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более недели. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

НОСОВЫЕ И ФАРИНГЕАЛЬНЫЕ СМЫВЫ: ватный тампон (зонд) после отбора материала поместить в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера, пробирку с тампоном плотно закрыть. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 10 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

ОРГАНЫ: для исследования использовать кусочки лимфоузлов, печени, селезенки, миндалин, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 10 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Образец органа измельчить стерильными ножницами или растереть в физиологическом растворе или в фосфатном буфере (приготовить примерно 10% суспензию). Для выделения РНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

КОНТРОЛИ: использовать **внутренний контрольный образец (ВКО) и отрицательный контроль на этапе выделения РНК (п.3.2), а также положительный и отрицательный контроль на этапе постановки ПЦР (п.3.3).** На каждые 7 исследуемых проб рекомендуется использовать один отрицательный контроль выделения (ОКВ), один отрицательный контроль ПЦР (ОК) и один положительный контроль ПЦР ВД. Положительным контролем этапа ПЦР служит рекомбинантная плазида, содержащая фрагмент генома виру-

са диареи крупного рогатого скота. В качестве отрицательных контролей используется деионизованная вода.

- На этапе выделения РНК (п.3.2) использовать внутренний контрольный образец (ВКО) в количестве 15 мкл для каждой исследуемой пробы, включая ОКВ. Пробирку с ВКО размораживать непосредственно перед использованием. В качестве ОКВ использовать 200 мкл деионизованной воды.

- На этапе проведения ПЦР в реальном времени (п.3.3) использовать 5 мкл положительного контроля ПЦР ВД. Пробирку с положительным контролем размораживать непосредственно перед использованием. В качестве отрицательных контролей использовать 5 мкл выделенного ОКВ и 5 мкл ОК.

ВКО и положительный контроль ПЦР ВД хранить при температуре от минус 18°C до минус 20°C, размораживать непосредственно перед использованием.

3.2 Выделение РНК

Для выделения РНК из исследуемого биологического материала следует использовать **Набор I - для выделения РНК.**

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая ОКВ.
- В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, прогреть их при температуре от 60°C до 65°C до полного растворения.
- Внести в каждую подготовленную пробирку по 600 мкл раствора-1.
- В подготовленные пробирки с раствором-1 внести по 15 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО).
- В подготовленные пробирки с раствором-1 и ВКО внести по 200 мкл образцов в следующей последовательности:

1. В пробирку маркированную «ОКВ» внести 200 мкл деионизованной воды;
2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;

Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером (фильтром).

- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”.
- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2)°C, каждые 3 минуты перемешивая на смесителе типа “Vortex”.
- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая ОКВ. Пробирку с сорбентом встряхнуть на смесителе типа “Vortex”, до полного ресуспендирования сорбента. В каждую пробирку внести по 40 мкл ресуспендированного сорбента.

- Инкубированные пробы центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эппендорф” 1 минуту при максимальном количестве оборотов. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести ОКВ, затем исследуемые пробы. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре (20±2)°C, каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

- Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальном количестве оборотов. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

- К осадку добавить 100 мкл раствора-2, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальном количестве оборотов. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

Процедуру повторить еще раз.

- К осадку добавить 100 мкл раствора-3, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальном количестве оборотов. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

Процедуру повторить еще раз.

- Осадок сушить в течение 5 минут при 56°C, крышки у пробирок должны быть открыты.
- Добавить к осадку 30 мкл деионизованной воды, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования осадка.

- Инкубировать пробы 10 минут при 56°C в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на смесителе типа “Vortex”. Центрифугировать в течение 1 мин при максимальном количестве оборотов. Надосадочная жидкость содержит выделенную РНК проб и ВКО и предназначена для проведения ПЦР. Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных проб. Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6°C не более 15 минут.

- При необходимости длительного хранения, следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные маркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать отрицательный контроль, затем исследуемые пробы. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные пробы заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР, не допускается многократное размораживание проб.

3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовать **Набор II – для выявления РНК вируса диареи крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени.**

3.3.1 Подготовка пробирок и приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР в реальном времени

Отобрать и маркировать необходимое количество пробирок с оптически прозрачной крышкой объемом 0,2 мл с учетом положительного («К+») и отрицательных («ОКВ», «ОК») контролей.

В отдельной пробирке приготовить общую реакционную смесь на n+1 образцов, где n – количество проб с учетом всех контролей. Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 2. Все реактивы **кроме Таq-полимеразы и MMLV-ревертазы** должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда. **Таq-полимеразу и MMLV-ревертазу** добавлять в последнюю очередь, при составлении смеси их следует держать во льду.

Перед открыванием пробирок с Таq-полимеразой и MMLV-ревертазой рекомендуется осадить капли со стенок и крышки кратким центрифугированием.

Таблица 2

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР	15,25	15,25 x (n+1)
ПЦР-смесь ВД	4,50	4,50 x (n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)
MMLV-ревертаза	0,125	0,125 x (n+1)

Реакционную смесь перемешать, избегая образования пены. Осадить капли с крышки и стенок пробирки кратковременным центрифугированием. Немедленно внести по 20 мкл реакционной смеси в маркированные пробирки:

- 1) в пробирку, маркированную «ОК» внести 5 мкл отрицательного контроля ОК;
- 2) в пробирку, маркированную «ОКВ» внести 5 мкл выделенного отрицательного контроля ОКВ;
- 3) в соответствующие пробирки внести по 5 мкл выделенных исследуемых проб, полученных после проведения этапа 3.2;
- 4) в пробирку, маркированную «К+» внести 5 мкл положительного контроля ПЦР ВД. Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Поместить пробирки в прибор для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

3.3.2 Проведение ПЦР в реальном времени с помощью прибора ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

- Запустить программу **RealTime_PCR**;
- В диалоговом окне выбора режима работы программы выбрать существующего оператора или добавить нового оператора. Затем выбрать режим **Работа с прибором**;
- В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый для работы прибор и нажать кнопку **Подключить**. После этого на экране появится окно работы с прибором. Необходимо дождаться, пока кнопка **Прибор включен** станет зеленого цвета;
- В меню **Тест** в верхней части рабочего окна **RealTime_PCR** выбрать команду **Создать/редактировать тест**;
- Выбрать **Создать новый тест**, ввести название нового теста и нажать **ОК**. На экране появится окно **Тест**;
- В поле **Описание** рекомендуется указать назначение и особенности теста; в пункте **Анализ** в окошке **Тип** выбрать **Качественный**, в окошке **Метод** выбрать **Пороговый (Ст)**; в пункте **Пробирки** отметить образцы, которые будут использоваться при проведении исследования: **Образец**, **Контроль +**, **Контроль -**; в пункте **Контроли** указать количество используемых положительных и отрицательных контрольных образцов; в пункте **Объем рабочей смеси в пробирке** выставить **25 мкл**;
- В пункте **Флуорофоры** для каналов **Fam** и **Hex** выбрать пункт **Специфика**, для остальных каналов – пункт **Отсутствует**. По каналу **Fam** регистрируется амплификация кДНК вируса диареи крупного рогатого скота, по каналу **Hex** регистрируется амплификация кДНК внутреннего контрольного образца.
- В пункте **Программа амплификации** выбрать кнопку **Создать новую программу**; в окне **Шаблон программ амплификации** выбрать наиболее подходящий по структуре шаблон. Нажать кнопку **Применить**. При необходимости использовать кнопки **Добавить строку**, **Удалить строку**, **Добавить блок**, **Удалить блок**;
- В поле **Имя программы** написать название программы; при необходимости заполнить поле **Описание**;
- Отредактировать программу амплификации для выявления РНК вируса диареи крупного рогатого скота. Для этого выставить температурно-временные параметры согласно таблице 3:

Таблица 3

№ блока	Температура, °C	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	50,0	30	0	1	
	94,0	5	0		
2	94,0	0	10	5	
	48,0	0	20		
	72,0	0	20		
3	94,0	0	10	40	
	48,0	0	20		✓
	72,0	0	20		

- Нажать кнопку **ОК**;
- В появившемся окне в поле **Имя файла** ввести имя созданной программы, используя буквы латинского алфавита; в поле **Папка** выбрать папку на диске для сохранения программы и нажать кнопку **Сохранить**;
- В появившемся окне **Тест** нажать кнопку **ОК**;
- На экране появится рабочее окно **RealTime_PCR** и вкладка **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в открывшемся окне выбрать название своего теста из списка;

• Указать количество исследуемых образцов и количество повторов (дублей) каждого образца в разделе **Образцы**. При необходимости можно изменить количество положительных и отрицательных контролей. Нажать кнопку **ОК**. Данные вносятся в протокол автоматически. При необходимости можно их отредактировать непосредственно в окне протокола. Расположение пробирок в блоке амплификатора также заполняется автоматически, при необходимости можно расположить их в произвольном порядке.

- Для перехода к запуску программы амплификации нажать кнопку **Применить**;
- На экране появится вкладка **Запуск программы амплификации**. При необходимости можно заполнить поле **Комментарий**;
- Проверить программу амплификации, при необходимости ее можно отредактировать, нажав кнопку **Редактировать**. На экране появится окно **Редактор программ амплификации** с таблицей данных используемой программы;
- После внесенных изменений нажать кнопку **ОК**. На экране появится окно запуска программы амплификации.
- Подготовить пробирки согласно п.3.3.1;
- В окне запуска программы амплификации нажать кнопку **Открыть блок**. Поставить подготовленные пробирки в гнезда амплификатора строго в соответствии с расположением, указанным в протоколе. Нажать кнопку **Заккрыть блок**;
- Нажать кнопку **Запуск программы**.
- Назвать эксперимент и сохранить его на диске.
- После завершения работы программы нажать кнопку **ОК**, чтобы перейти к анализу оптических измерений.

3.3.3 Проведение ПЦР в реальном времени с помощью прибора «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

• Поместить подготовленные в п.3.3.1 пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene. Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 или «Rotor-Gene» 6000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6 или 1.7 (build 67) соответственно, или выше. Провести программирование амплификатора:

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы;
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**;
- Нажать кнопку **Next/Далее**;
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл;
- Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 ml oil layer volume/15.L объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

• В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**. Задать следующие параметры эксперимента:

1. Hold/Удерж.темп-ры 50°C – 30 мин;
2. Hold/Удерж.темп-ры 94°C – 5 мин;
3. Cycling/Циклирование 94°C – 10с,
48°C – 20с,
72°C – 20с
Cycle repeats/Цикл повторить 5 times/раз.
4. Cycling/Циклирование 94°C – 10с,
48°C – 20с – Детекция флюоресценции
72°C – 20с
Cycle repeats/Цикл повторить – 40 times/раз.

• Флюоресценцию измерять при 48°C на каналах FAM/Green, JOE/Yellow. По каналу FAM/Green регистрируется амплификация кДНК вируса диареи крупного рогатого скота, по каналу JOE/Yellow регистрируется амплификация кДНК внутреннего контрольного образца.

Нажать дважды кнопку **ОК/Да**.

• В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before**

1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции. Для обоих каналов (FAM/Green, JOE/Yellow) установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5FI** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10FI**. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске. В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

IV. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1 Анализ результатов амплификации на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

После завершения работы программы нажать кнопку **OK** и перейти к анализу результатов оптических измерений:

1. В поле **Тип анализа** указать **Ct (Cp)** для всех каналов, в поле **Метод – Пороговый (Ct)**;
2. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. В открывшейся вкладке установить: **Критерий положительного результата ПЦР – 90%**, **Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 10%**, **верхняя граница/порог нормализации данных – 30%**. Нажать кнопку **Применить**.
3. Для обоих каналов (Fam и Hex) установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) так, чтобы она пересекала кривую флуоресценции на участке характерного экспоненциального подъема, переходящего в линейный подъём.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 4.

Оценка результатов анализа исследуемых проб

Таблица 4

Название пробы	Значение Ct по каналу		Результат анализа	Комментарий
	FAM	HEX		
Проба №1	<35	<33	Положительный	В пробе обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота
Проба №2	<35	≥33 или нет значений	Положительный	В пробе обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота
Проба №3	нет значений	<33	Отрицательный	В пробе не обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота
Проба №4	≥35	<33	Сомнительный	Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК и считать, что в образце обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота при получении аналогичного результата
Проба №5	≥35 или нет значений	≥33 или нет значений	Недостоверный	Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции РНК
OKB	Нет значений	<33	Отрицательный	Отрицательный контроль выделения достоверен
OK	Нет значений	Нет значений	Отрицательный	Отрицательный контроль ПЦР достоверен
K+	<33	Нет значений	Положительный	Положительный контроль ВД ПЦР достоверен

В пробе **обнаружена** РНК вируса диареи крупного рогатого скота, если для данной пробы значение C_t на канале FAM менее 35.

В пробе **не обнаружена** РНК вируса диареи крупного рогатого скота, если для данной пробы по каналу FAM значение C_t отсутствует или кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию, а по каналу HEX определено значение C_t , не превышающее 33.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы на канале FAM получено значение C_t больше 35, а значение C_t по каналу HEX не превышает 33. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК, и считать, что в пробе обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота при получении аналогичного результата.

Результат анализа **недостоверный**, если для данной пробы значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора FAM не определено (отсутствует), равно или превышает 35, и по каналу для флуорофора HEX значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает 33. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов (таблица 4).

4.2 Анализ результатов амплификации на приборе «Rotor-Gene» 3000/6000

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**;

2. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек.уклона**;

3. В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**;

4. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.01**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения C_t .

6. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**;

7. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек.уклона**;

8. В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**;

9. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

10. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.01**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения C_t .

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 5.

Оценка результатов анализа образцов

Название пробы	Значение Ct по каналу		Результат анализа	Комментарий
	FAM/Green	JOE/Yellow		
Проба №1	<35	<33	Положительный	В пробе обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота
Проба №2	<35	≥33 или нет значений	Положительный	В пробе обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота
Проба №3	нет значений	<33	Отрицательный	В пробе не обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота
Проба №4	≥35	<33	Сомнительный	Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения РНК и считать, что в образце обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота при получении аналогичного результата
Проба №5	≥35 или нет значений	≥33 или нет значений	Недостоверный	Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения РНК
ОКВ	Нет значений	<33	Отрицательный	Отрицательный контроль выделения достоверен
ОК	Нет значений	Нет значений	Отрицательный	Отрицательный контроль ПЦР достоверен
К+	<33	Нет значений	Положительный	Положительный контроль ВД ПЦР достоверен

В образце **обнаружена** РНК вируса диареи крупного рогатого скота, если для данной пробы значение Ct на канале FAM/Green менее 35.

В образце **не обнаружена** РНК вируса диареи крупного рогатого скота, если для данной пробы по каналу FAM/Green значение Ct отсутствует (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу JOE/Yellow определено значение Ct, не превышающее 33.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы на канале FAM/Green получено значение Ct больше 35, а значение Ct по каналу JOE/Yellow не превышает 33. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения РНК, и считать, что в образце обнаружена РНК вируса диареи крупного рогатого скота при получении аналогичного результата.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов анализа образцов (таблица 5).

V. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. Работать необходимо в перчатках. При случайном попадании компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16.