



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

26 ЯНВ 2022

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для обнаружения вируса парагриппа-3 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения вируса парагриппа-3 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

1.2 Тест-система состоит из двух наборов и рассчитана на проведение 50 анализов, включая контрольные образцы:

№	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	1 пробирка
Набор II - для выявления РНК вируса парагриппа-3 методом ПЦР в реальном времени			
1	Таг-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	MMLV-ревертаза	0,008 мл	1 пробирка
3	Положительный контроль ПГ-3	0,2 мл	5 пробирок
4	Праймеры для ПЦР ПГ-3	0,27 мл	1 пробирка
5	Зонд ПГ-3	0,06 мл	1 пробирка
6	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для обнаружения вируса парагриппа-3 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в инфицированных клеточных культурах и патматериале от крупного рогатого скота (кровь, сыворотка крови, носовые и фарингеальные смывы, органы павших или вынужденно убитых животных).

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-систем расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 20 мл и 13 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия 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, упакованный в полиэтиленовый пакет, вложен в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены несмываемой краской следующие обозначения: страна, город, название организации-производителя и/или товарный знак, полное название тест-системы, номер серии и контроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), предупредительная надпись «Для ветеринарного применения», количество анализов и обозначение СТО. В каждую коробку вложена инструкция по применению тест-системы.

1.4 Условия хранения и транспортирования

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

Транспортирование Набора I проводить при температуре от 2 до 25°C. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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 плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов проводят, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20-24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т или аналогичные.

II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Анализ по определению вируса парагриппа-3 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени включает выделение суммарной РНК, проведение совмещенной реакции обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента методом ПЦР и анализ результатов, появляющихся в ходе реакции на экране монитора в виде графика.

Особенность полимеразной цепной реакции в реальном времени - возможность регистрации результата ПЦР в процессе реакции, в каждый момент времени.

Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют ДНК-зонд (короткий одноцепочечный фрагмент ДНК, синтезированный химическим путем), комплементарный внутреннему участку фрагмента РНК вируса парагриппа-3.

К зонду присоединены два химических соединения или две молекулы: флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции (FAM-BHQ соответственно). В ходе ПЦР происходит разрушение зонда, разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к появлению свечения. Прибор регистрирует интенсивность свечения, в результате чего исследователь может узнать о результатах реакции. Существенным преимуществом является то, что регистрация результатов происходит без открывания пробирки, т. е. полностью исключается контаминация продуктами ПЦР.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Подготовка к работе

3.1.1 Необходимые условия успешного проведения анализа

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

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромпиком, отмыта, простерилизована.

Пробирки с вирусным материалом должны быть всегда закрытыми. При отборе вирусосодержащих суспензий работать наконечниками с фильтром.

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

Однократно использовать пластиковую посуду (наконечники и пробирки). Ранее использованные, мытые наконечники и пробирки использовать нельзя!

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

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

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышке удалять центрифугированием. При открывании и закрывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

3.1.2 Подготовка исследуемого материала

- **КРОВЬ:** пробы цельной крови должны быть обязательно консервированы 3-6%-ным раствором ЭДТА или 3,8%-ным раствором цитрата натрия. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Пробирки с цельной кровью смешанной с антикоагулянтом хранить и транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для выделения РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.
- **СЫВОРОТКА КРОВИ:** пробы хранить и транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток, при температуре от минус 18 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.
- **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 до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18 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, легких, бронхов, печени, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18 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 положительные и отрицательные контроли на этапе выделения РНК (п. 3.2). Рекомендуется использовать по одному положительному и одному отрицательному контролю на каждые 8 исследуемых проб. Пробирку с положительным контролем ПГ-3 (культура клеток, инфицированная вирусом парагриппа-3 крупного рогатого скота) размораживать непосредственно перед выделением РНК. Повторной заморозке положительный контроль не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл положительного контроля ПГ-3. Выделенную РНК (5 мкл) использовать для постановки ПЦР в реальном времени (п. 3.3). Для длительного хранения выделенной РНК необходимо аккуратно, не захватывая сорбент отобрать раствор РНК, перенести его в стерильную пробирку и хранить при температуре от минус 18 до минус 20°C не более 7 суток, не допуская многократного размораживания.

В качестве отрицательного контроля использовать 200 мкл деионизованной воды.

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18 до минус 20°C, размораживать непосредственно перед использованием.

3.2 Выделение РНК для анализа

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

Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая положительный («К+») и отрицательный («К-») контроли выделения.

- В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, инкубировать их при температуре от 60 до 65°C до полного растворения.
- Внести в каждую подготовленную пробирку по 600 мкл раствора-1.

- В подготовленные пробирки с раствором-1 внести по 200 мкл образцов биологического материала и контролей в следующей последовательности:
 1. В пробирку, маркированную «К-», внести 200 мкл деионизованной воды;
 2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;
 3. В пробирку, маркированную «К+», внести 200 мкл положительного контроля ПГ-3.
- Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”.
- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$, каждые 3 минуты перемешивая на смесителе типа “Vortex”.
- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая «К+» и отрицательный «К-». 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 на максимальном количестве оборотов. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». 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 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$, каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.
- Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек на 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 на микроцентрифуге в течение 15 сек на 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 на микроцентрифуге в течение 15 сек на максимальном количестве оборотов. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.
- Осадок подсушить в течение 10 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 на максимальном количестве оборотов. Надосадочная жидкость содержит выделенную РНК и предназначена для проведения ПЦР в реальном времени. Рекомендуется проводить ПЦР в реальном времени сразу после получения выделенных РНК-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 взмучился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные пробы заморозить при температуре от минус 18 до минус 20°C и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР, не допускается многократное размораживание проб.

3.3 Проведение ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовать **Набор II - для выявления РНК вируса парагриппа-3 методом ПЦР в реальном времени.**

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

Подготовить необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, с учетом положительных и отрицательных контролей.

В отдельной пробирке приготовить общую реакционную смесь на n+1 проб (n – количество проб с учетом положительных и отрицательных контролей). Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 1. Все реактивы, **кроме Таq-полимеразы и MMLV-ревертаза** должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Перед открыванием пробирок рекомендуется осадить капли со стенок и крышек кратким центрифугированием (5-10 сек). Таq-полимеразу и MMLV-ревертазу добавить в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать их во льду, нагревание не допускается.

таблица 1

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР	15, 25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР ПГ-3	4,5	4,5x (n+1)
Зонд ПГ-3	1,0	1,0x(n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)
MMLV-ревертаза	0,125	0,125 x (n+1)

Смесь перемешать пипетированием, избегая образования пены. Осадить капли с крышки и стенок пробирки кратковременным центрифугированием. Немедленно внести по 20 мкл смеси в подготовленные пробирки. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по 5 мкл выделенных проб в следующей последовательности:

- 1) в пробирку для отрицательного контроля внести 5 мкл «К-»;
- 2) в соответствующие пробирки внести по 5 мкл исследуемых образцов;
- 3) в пробирку для положительного контроля ПГ-3 внести 5 мкл «К+»;

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 с кнопкой **Прибор включен** (необходимо дождаться, пока кнопка 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 (Ct)**; 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 канала **Fam** выбрать пункт **Специфика**, для остальных каналов – пункт **Отсутствует**;
- 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 детекции РНК ПГ-3. Для этого выставить температурно-временные параметры, указанные в таблице 2.

таблица 2

№ блока	Температура, С ⁰	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	50,0	30	0	1	
	95,0	5	0		
2	95,0	0	15	40	
	55,0	0	15		✓
	72,0	0	30		

- 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 отредактировать ее, 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 **Закрыть блок**;
- Нажать клавишу **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. Hold2/Удерж. темп-ры2 95 °C - 5 мин
 3. Cycling/Циклирование 95 °C - 15 с
55 °C - 15 с
72 °C – 30 с
Cycle repeats – 5 times/раз
 4. Cycling2/Циклирование2 95 °C - 15 с
55 °C - 15 с – Детекция флуоресценции
72 °C – 30 с
Cycle repeats – 40 times/раз

Флюоресценцию измерять при 55°C на канале **FAM/Green**.

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 канала **FAM/Green** установить параметры **Min Reading/Миним. сигнал** – 5F1 и **Max Reading/Максим. сигнал** – 10F1. 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**.

3.3.4 Проведение ПЦР в реальном времени с помощью прибора BioRadiQ5 («Bio-Rad», США).

Чтобы начать работу на приборе BioRadiQ5 необходимо:

1. Включить прибор
2. Включить компьютер
3. Открыть программу BioRadiQ5
4. В закладке **Protocol** создать новый документ (активизировать «иконку» **Creat new**), заполняя таблицу следующим образом:

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint	PCR/MeltData Acquisition	
1	1					
		1	30:00	50.0		
2	1					
		1	5:00	95.0		
3	40					
		1	0:15	95.0		
		2	0:15	55.0		
		3	0:30	72.0		Real Time

5. Сохранить файл (**Save & Exit Protocol Editing**)
6. В закладке **Plate** создать новый документ:
 - активизировать «иконку» **Creat new**;

- обозначить лунки, в которых предполагается разместить пробирки с исследуемой реакционной смесью;
- из списка флуорофоров выбрать соответствующий краситель
- в верхнем правом углу закладки **Setup** изменить параметры

Sample Volume

Seal Type

Vessel Type в соответствии с калибровкой прибора;

- сохранить документ (**Save & Exit Protocol Editing**);

7. Подготовить пробирки для n+1 образцов с реагентами для ПЦР в реальном времени по п. 3.3.1.

8. Поместить пробирки с исследуемой реакционной смесью в лунки термоциклера;

9. В окне **Data File** активизировать «иконку» **Run**, затем **Run End Point**.

IV УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

4.1 Анализ результатов ПЦР в реальном времени, полученных с помощью прибора ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

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

4.1.1 В поле **Тип анализа** указать **St(Cp)** для всех каналов, в поле **Метод – Пороговый (St)**;

4.1.2 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**.

4.1.3 Для канала FAM 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 3.

таблица 3

Название образца	Сигнал по каналу Fam	Комментарии к результатам
К-	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус ПГ-3.
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	В образце находится вирус ПГ-3. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В образце отсутствует вирус ПГ-3. Образец считать отрицательным.
К+	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует вирус ПГ-3.

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей, согласно таблице 3. В случае появления в отрицательном контроле значения $Ct \leq 34$ результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить исследование всех проб, начиная с этапа выделения РНК, а также принять меры для ликвидации контаминации.

4.2 Анализ результатов ПЦР в реальном времени, полученных с помощью прибора «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия).

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

4.2.2. 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**;

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

4.2.4. 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**).

4.2.5. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.03**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 4.

таблица 4

Название образца	Сигнал по каналу Fam	Комментарии к результатам
К-	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус ПГ-3
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	В образце находится вирус ПГ-3. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В образце отсутствует вирус ПГ-3. Образец считать отрицательным.
К+	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует вирус ПГ-3.

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей, согласно таблице 4. В случае появления в отрицательном контроле значения $Ct \leq 34$ результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить исследование всех проб, начиная с этапа выделения РНК, а также принять меры для ликвидации контаминации.

4.3 При работе на приборе BioRadiQ5

По окончании реакции в окне **PCR Quant** появится график зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов. Кривые, преодолевшие пороговый уровень, считаются положительными, кривые ниже уровня пороговой линии считаются отрицательными. Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей.

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