



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

января

2018 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

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

### I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения вируса классической чумы свиней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

1.2 Тест-система состоит из двух 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	Вода деионизованная	2,0 мл	2 пробирки
Набор II - для выявления РНК вируса КЧС методом ПЦР в реальном времени			
1	Таq-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	MMLV- ревертаза	0,008 мл	1 пробирка
3	Положительный контроль КЧС	1,0 мл	2 флакона
4	Праймеры для ПЦР КЧС	0,27 мл	1 пробирка
5	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка
6	Зонд КЧС	0,06 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для обнаружения вируса классической чумы свиней (КЧС) методом полимеразной цепной реакции в инфицированных клеточных культурах и материале от животных (кровь, сыворотка крови, лимфоузлы, фрагменты селезенки, печени, сердца).

#### 1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 20 мл и 13 мл, стеклянные флаконы по 1 мл, герметично укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками, пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками 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 разработчика 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 типографским способом следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя, полное наименование тест-системы, количество анализов, номер серии и контроля, дата изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение СТО, надпись «Для ветеринарного применения». В каждую упаковку 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.

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

**Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.**

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 необходимо проводить, 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**

Анализ по определению вируса КЧС методом ПЦР в реальном времени включает выделение суммарной РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента методом ПЦР в реальном времени.

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 генома вируса КЧС. 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. Регистрируя интенсивность свечения, исследователь может узнать о ходе реакции без дополнительной стадии – электрофореза.

Существенным преимуществом является то, что регистрация результатов реакции происходит в закрытой пробирке, 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).

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

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

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромовой смесью, отмыта, стерилизована.

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять центрифугированием.

При открывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

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.).

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

### **3.1.2 Подготовка и хранение 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°C 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°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.

• **ОРГАНЫ:** для исследования использовать фрагменты лимфоузлов, печени, селезенки, сердца, 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 положительные и отрицательные контроли на этапе выделения РНК (п. 3.2). В качестве положительных контролей используется лиофилизированный вакцинный штамм вируса КЧС. Рекомендуется использовать по одному подготовленному положительному и одному отрицательному контролю на каждые 8 исследуемых проб.

**Подготовка положительных контролей КЧС:** во флакон с положительным контролем КЧС добавить 1 мл дедионизованной воды или раствора-1, перемешать пипетированием до полного растворения и внести по 200 мкл получившегося раствора в отдельные пробирки на 1,5-2,0 мл. Пробирки с раствором положительного контроля КЧС хранить при температуре от минус 18°C до минус 20°C. Размораживать пробирку с подготовленным положительным контролем непосредственно перед выделением РНК, повторной заморозке не подлежит. Выделенную РНК (5 мкл) использовать для постановки ПЦР в реальном времени (п. 3.3). В качестве отрицательного контроля использовать 200 мкл дедионизованной воды.

Флаконы, содержащие лиофилизированный положительный контроль, хранить при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

### **3.2 Выделение РНК**

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°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 200 мкл образцов биологического материала и контролей в следующей последовательности:

1) В пробирку, маркованную «К-», внести 200 мкл дедионизованной воды;

2) В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;

3) В пробирку, маркованную «К+», внести 200 мкл положительного контроля КЧС.

• Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

• 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 «К+» и «К-». Пробирку с сорбентом встрихнуть на смесителе типа “Vortex”, до

полного ресуспенсирования сорбента. В каждую пробирку внести по 40 мкл ресуспенсированного сорбента.

- Инкубированные пробы центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эппendorф” 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 ресуспенсирования сорбента.

- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре ( $20\pm2$ )°С, каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспенсирования 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 ресуспенсирования 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 ресуспенсирования 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 сушить 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 ресуспенсирования 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 предназначается для проведения ПЦР в реальном времени (п. 3.3). 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 маркованные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные РНК-пробы заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием, 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 КЧС 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 2. Все реактивы, кроме Таq-полимеразы

и MMLV-ревертазы, должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда. Перед открыванием пробирок рекомендуется осадить капли со стенок и крышечек кратким центрифугированием (5-10 сек). Та<sup>q</sup>-полимеразу и MMLV-ревертазу добавить в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать их во льду, нагревание не допускается.

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)
Праймеры для ПЦР КЧС	4,5	4,5 x (n+1)
Зонд КЧС	1,0	1,0 x (n+1)
Та <sup>q</sup> -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 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 OK. 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 КЧС. Для этого выставить температурно-временные параметры, указанные в 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	15	40	
	50,0	0	15		✓
	72,0	0	30		

- Нажать кнопку **OK**;

• 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 **OK**.

• 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 **OK**;

• 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 **OK**. 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 **OK**, 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	94°C - 5 мин
3. Cycling/Циклирование	94°C - 15 с
	50°C - 20 с
	72°C – 15 с
4. Cycling2/Циклирование2	Cycle repeats – 5 times/раз
	94°C - 15 с
	50°C - 20 с – Детекция флуоресценции
	72°C – 15 с
	Cycle repeats – 40 times/раз

Флюоресценцию измерять при 50°C на канале FAM/Green.

Нажать дважды кнопку **OK/Да**.

- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Oпт. 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 – 5Fl** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10Fl**. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Закрыть**.

- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

- Дать название эксперименту 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 (таблица 4):

Таблица 4

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	50.0	
		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 исследуемыми образцами;

- 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 по п. 3.3.1.

8. Поместить пробирки в лунки термоциклира;
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 **OK** и перейти к анализу результатов оптических измерений:

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

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 подъем.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 5.

Таблица 5

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

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей, согласно таблице 5. В случае появления в отрицательном контроле значений  $Ct \leq 34$  результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить исследование всех проб, начиная с этапа выделения РНК, приняв 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 = 0.01**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 6.

Таблица 6

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

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей, согласно таблице 6. 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, приняв меры для ликвидации контаминации.

#### 4.3 Анализ результатов ПЦР в реальном времени, полученных с помощью прибора BioRadiQ5 («Bio-Rad», США)

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. 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