



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

«15» сентября 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

1.2 Тест-система состоит из двух наборов и рассчитана на проведение 50 анализов с двумя зондами для двух типов вируса РРСС, 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	Вода деионизованная	2,0 мл	1 пробирка
Набор II - для выявления РНК вируса РРСС методом ПЦР в реальном времени			
6	Тaq-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
7	MMLV-ревертаза	0,008 мл	1 пробирка
8	Положительный контроль №1 (европейский штамм РРСС)	0,2 мл	5 пробирок
9	Положительный контроль №2 (американский штамм РРСС)	0,2 мл	5 пробирок
10	Праймеры для ПЦР РРСС	0,27 мл	1 пробирка
11	Зонд №1 РРСС	0,06 мл	1 пробирка
12	Зонд №2 РРСС	0,06 мл	1 пробирка
13	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для обнаружения вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в инфицированных клеточных культурах и материале от животных (кровь, сыворотка крови, сперма, носовые и конъюнктивальные смывы, паренхиматозные органы). Тест-система позволяет дифференцировать европейский и американский типы вируса РРСС.

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

Набор I необходимо хранить при температуре от 2⁰С до 25⁰С, Набор II – при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С.

Транспортирование Набора I проводить при температуре от 2⁰С до 25⁰С. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разукomплектовать 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

2.1 Анализ по определению вируса РРСС методом ПЦР в реальном времени включает выделение суммарной РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации специфических фрагментов 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-зонды, комплементарные внутренним участкам фрагментов РНК вируса РРСС европейского и американского штаммов.

2.2 В тест-системе используются 2 зонда с различными красителями. К зондам присоединены два химических соединения, или две молекулы: флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции (FAM-BHQ и JOE-BHQ соответственно). В ходе ПЦР происходит разрушение зондов, разъединение флуоресцентных меток и гасителей, 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 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).

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 ПЦР в реальном времени следует в одноразовых перчатках.

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 2⁰С до 8⁰С 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 2⁰С до 8⁰С не более 5 суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С 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 кусочки лимфоузлов, печени, селезенки, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 3 суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С 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.
- **НОСОВЫЕ И КОНЪЮНКТИВАЛЬНЫЕ 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 2⁰С до 8⁰С не более 3 суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С 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.
- **СПЕРМА:** пробы хранить при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С 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.
- **КОНТРОЛИ:** положительный контроль №1 представляет собой культуру клеток, инфицированную вирусом европейского штамма РРСС, положительный контроль №2 представляет собой культуру клеток, инфицированную вирусом американского штамма РРСС. Пробирки с положительными контролями размораживать непосредственно перед использованием, повторной заморозке не подлежат. Для исследования использовать 200 мкл. Выделенную РНК (5 мкл) использовать для постановки ПЦР (п.3.3). В качестве отрицательного контроля использовать 200 мкл деионизированной воды.

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С, размораживать непосредственно перед использованием.

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 положительные («К+№1», «К+№2») и отрицательный («К-») контроли выделения.

- В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, прогреть их при температуре от 60 до 65⁰С 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 деионизированной воды;
 2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;

3. В пробирку, маркированную «К+№1» внести 200 мкл положительного контроля №1 (европейский штамм вируса РРСС);
 4. В пробирку, маркированную «К+№2» внести 200 мкл положительного контроля №2 (американский штамм вируса РРСС).
- 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+№1», «К+№2» и «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 при максимальном количестве оборотов. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести отрицательный контроль, затем исследуемые пробы, затем положительные контроли. 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 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 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 при максимальных оборотах. Надосадочная жидкость содержит выделенную РНК и предназначена для проведения ПЦР (п. 3.3). Рекомендуется проводить ПЦР 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 отрицательный контроль, затем исследуемые пробы, затем положительные контроли. 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 в ПЦР (п. 3.3), 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 РРСС 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-ревертазы**, 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 РРСС	4,5	4,5x ($n+1$)
Зонд №1 РРСС	1,0	1,0x($n+1$)
Зонд №2 РРСС	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 №1 внести 5 мкл «К+№1»;
- 4) в пробирку для положительного контроля №2 внести 5 мкл «К+№2»;

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 каналов **Fam** и **Nex** 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 вируса РРСС и дифференциации европейского и американского штаммов. 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	
	50,0	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 $50^{\circ}\text{C} - 30 \text{ мин}$;

2. Hold2/Удерж.темп-ры2 $95^{\circ}\text{C} - 5 \text{ мин}$;

3. Cycling/Циклирование $95^{\circ}\text{C} - 15\text{с}$,

 $50^{\circ}\text{C} - 15\text{с}$,
 $72^{\circ}\text{C} - 30 \text{ с}$

Cycle repeats/Цикл повторить 5 times/раз.

4. Cycling2/Циклирование2 $95^{\circ}\text{C} - 15\text{с}$,

 $50^{\circ}\text{C} - 15\text{с} - \text{Детекция флюоресценции}$
 $72^{\circ}\text{C} - 30\text{с}$

Cycle repeats/Цикл повторить – 40 times/раз.

Флюоресценцию измерять при 50°C на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow**.

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/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** и **JOE/Yellow** установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5Fl** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10Fl**. 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	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 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 **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 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 3.

таблица 3

Название образца	Сигнал по каналу Fam	Сигнал по каналу Hex	Комментарии к результатам
К-	отсутствует, или $Ct \geq 35$	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус РРСС американского и европейского типов.
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В образце присутствует вирус РРСС европейского типа. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует, или $Ct \geq 35$	присутствует, $Ct \leq 34$	В образце присутствует вирус РРСС американского типа. Образец считать положительным.
К+№1	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В положительном контроле присутствует вирус РРСС европейского типа.
К+№2	отсутствует, или $Ct \geq 35$	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует вирус РРСС американского типа.

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных 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, 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 = 0.03**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

4.2.6. Провести аналогично анализ по каналу **JOE/Yellow**.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 4.

таблица 4

Название образца	Сигнал по каналу		Комментарии к результатам ПЦР в реальном времени
	FAM/Green	JOE/Yellow	
К-	отсутствует или $Ct \geq 35$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус РРСС американского и европейского типов.
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В образце присутствует вирус РРСС европейского типа. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует или $Ct \geq 35$	присутствует, $Ct \leq 34$	В образце присутствует вирус РРСС американского типа. Образец считать положительным.
К+№1	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В положительном контроле присутствует вирус РРСС европейского типа.
К+№2	отсутствует, или $Ct \geq 35$	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует вирус РРСС американского типа.

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных 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, приняв 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 положительных 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 одноразовых 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