



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
А.В. Кривонос
2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

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

1.2 Тест-система состоит из 2 наборов и рассчитана на проведение 50 анализов, включая контрольные образцы.

1.3 Тест-система представлена в универсальной комплектации (таблица 1).

таблица 1

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I – для выделения ДНК			
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 ДНК вируса африканской чумы свиней методом ПЦР в реальном времени			
1	Тақ-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	Праймеры АЧС в реальном времени	0,27 мл	1 пробирка
3	Зонд АЧС	0,06 мл	1 пробирка
4	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка
5	Положительный контроль выделения АЧС (ПКВ АЧС)	0,2 мл	5 пробирок
6	Положительный контроль определения АЧС (ПК АЧС)	0,03 мл	1 пробирка
7	Отрицательный контроль (ОК)	0,03 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для выявления вируса африканской чумы свиней в крови, органах и тканях от живых, павших и вынужденно убитых свиней, в готовой мясной продукции, содержащей свинину (колбасные изделия, фарш, полуфабрикаты и т.п.), а также в инфицированных культурах клеток.

1.4 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 20 мл и 13 мл, 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 спосо-

бом следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя, полное наименование тест-системы, вариант комплектации, 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.

1.5 Условия хранения и транспортирования.

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

Транспортирование Набора I упакованного в картонную или пластиковую коробку проводить при температуре от 2⁰С до 25⁰С. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка).

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

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления.

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 аналогичный.

II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

2.1 В основе метода лежит механизм репликации специфического фрагмента молекулы ДНК исследуемого образца ферментом Taq-ДНК-полимеразой в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров). Амплификация (количественное увеличение) специфического фрагмента ДНК происходит за счет многократного повторения циклов денатурации, отжига специфических праймеров и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-ДНК-полимеразы.

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.
- 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, а 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 простерилизованную.
- 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 ПЦР следует в одноразовых перчатках.

3.1.2 Необходимые материалы и оборудование

- Ламинарный бокс (класс биологической безопасности II);
- ПЦР-бокс;
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25⁰С до 100⁰С;
- Настольная центрифуга типа «Эппендорф»;
- Встряхиватель типа «Vortex»;
- Отсасыватель медицинский вакуумный с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- Холодильник бытовой от 2⁰С до 8⁰С 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 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;
- Микропробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф»;
- 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

Для исследования использовать следующие органы и ткани:

- **ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ, СЕЛЕЗЕНКА, МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ, МЯСНАЯ ПРОДУКЦИЯ:** пробы паренхиматозных органов, тканей и мясной продукции отбирать стерильными инструментами в одноразовые пластиковые флаконы. Пробы хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 24 ч, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 2 недель. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Приготовить 10% суспензию в стерильном физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе. Для этого кусочки органов, тканей и мясной продукции весом 1-2 г измельчить ножницами и гомогенизировать в стерильном физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе, используя стерильные фарфоровые ступки и пестики. Для выделения ДНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.
- **КРОВЬ:** цельную кровь в объеме 2 мл отобрать в одноразовые пластиковые пробирки с антикоагулянтом (3-6% раствор ЭДТА, 3,8% раствор цитрата натрия и т.п.). 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 исследования использовать 200 мкл цельной крови без предварительной подготовки
- **ИНФИЦИРОВАННАЯ КУЛЬТУРА КЛЕТОК (КК):** для исследования использовать 200 мкл суспензии КК, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.
- **КОНТРОЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения ДНК (п. 3.2) и постановки ПЦР (п.3.3). Положительными контролями служат генноинженерные препараты, содержащие фрагмент гена поверхностного белка VP73 вируса АЧС. В качестве отрицательных контролей используется деионизованная вода.
- На каждые 6 исследуемых проб рекомендуется использовать по одному отрицательному и одному положительному контролю на этапе выделения ДНК (контроль выделения), добавляя к ним по одному отрицательному и одному положительному контролю на этапе проведения ПЦР (контроль ПЦР).
- Пробирку с положительным контролем выделения (ПКВ АЧС) размораживать непосредственно перед выделением ДНК. Повторной заморозке положительный контроль

не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл. Выделенную ДНК (5 мкл) использовать для постановки ПЦР (п. 3.3). Для длительного хранения выделенной ДНК необходимо аккуратно, не захватывая сорбент, отобрать раствор ДНК, перенести его в стерильную пробирку и хранить при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 7 суток, не допуская многократного размораживания. В качестве отрицательного контроля выделения (ОКВ) использовать 200 мкл деионизованной воды.

- На этапе проведения ПЦР (п.3.3) использовать 5 мкл выделенной ДНК ПКВ АЧС и 5 мкл положительного контроля ПК АЧС. Пробирку с ПК АЧС размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР. В качестве отрицательных контролей использовать 5 мкл выделенного ОКВ и 5 мкл ОК.

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С.

3.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК из исследуемого патологического материала проводят с помощью **Набора I – для выделения ДНК.**

- В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, прогреть их при температуре от 60 до 65⁰С до полного растворения кристаллов;
- Отобрать и подписать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения (ОКВ) и положительный контроль выделения АЧС (ПКВ АЧС);
- Внести в каждую 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 «ОКВ», внести 200 мкл деионизованной воды;
 - 2) В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;
 - 3) В пробирку, маркированную «ПКВ АЧС», внести 200 мкл положительного контроля.

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

- Тщательно перемешать пробы на встряхивателе типа “Vortex”;
- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2⁰С), перемешивая каждые 3 минуты на встряхивателе;
- Отобрать и подписать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный и положительный контроли. Пробирку с сорбентом перемешивать на встряхивателе, до полного ресуспендирования сорбента. В каждую пробирку внести по 40 мкл ресуспендированного сорбента.
- Инкубированные пробы центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эппендорф” 1 минуту при максимальных оборотах. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести ОКВ, затем исследуемые пробы, затем ПКВ АЧС. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
- Перемешать пробы на встряхивателе до полного ресуспендирования сорбента.
- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре (20±2⁰С, каждые 3 минуты перемешивая пробы на встряхивателе до полного ресуспендирования сорбента.
- Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальных оборотах. 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 встряхивателе до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальных оборотах. 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 встряхивателе до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

Процедуру повторить еще раз.

- Осадок сушить в течение 10 минут при 56⁰С, крышки у пробирок должны быть **открыты!**
- Добавить к осадку 30 мкл деионизованной воды, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на встряхивателе до полного ресуспендирования осадка.
- Инкубировать пробы 10 минут при 56⁰С в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на встряхивателе. Центрифугировать в течение 1 мин при максимальных оборотах. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК и используется для проведения ПЦР (п.3.3).

ПЦР (п. 3.3) рекомендуется проводить сразу после выделения ДНК из исследуемых проб. **Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6⁰С не более 15 минут.** При необходимости длительного хранения, следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные промаркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать отрицательный контроль, затем исследуемые пробы, затем положительный контроль. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные ДНК-пробы заморозить при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР, не допускается многократное замораживание – оттаивание проб.

3.3 Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовать **Набор II – для выявления ДНК вируса африканской чумы свиней 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 всех положительных и отрицательных контрольных образцов.

В отдельной пробирке приготовить общую реакционную смесь на n+1 образцов, где n – количество проб с учетом отрицательного и положительного контролей выделения (ОКВ и ПКВ АЧС), а также отрицательного и положительного контролей ПЦР (ОК и ПК АЧС). Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 2. Все реактивы, **кроме Таq-полимеразы**, должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Таq-полимеразу добавить в последнюю очередь. Перед открыванием пробирки с Таq-полимеразой рекомендуется осадить капли с крышки и стенок кратким центрифугированием (5-10 сек). **При составлении смеси Таq-полимеразу следует держать во льду. Нагревание Таq-полимеразы не допускается.**

таблица 2

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n проб (мкл)
Буфер для ПЦР	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры АЧС в реальном времени	4,5	4,5 x (n+1)
Зонд АЧС	1,0	1,0 x (n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 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 проб в следующей последовательности:

- 1) в пробирку для ОК внести 5 мкл ОК;
- 2) в пробирку для ОКВ внести 5 мкл выделенного ОКВ;
- 3) в соответствующие пробирки внести по 5 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов;
- 4) в пробирку для ПКВ внести 5 мкл выделенного ПКВ АЧС;
- 5) в пробирку для ПК внести 5 мкл ПК АЧС.

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 v7.3**;
- 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 (St)**; 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 ДНК АЧС. Для этого выставить температурно-временные параметры, указанные в таблице 3:

таблица 3

№ блока	Температура С ⁰	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	50,0	2	0	1	
2	95,0	10	0	1	
3	95,0	0	15	40	
	58,0	1	0		✓

- 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 **Заккрыть 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:
 - Hold/Удерж.темп-ры 50°C – 2 минуты;
 - Hold/Удерж.темп-ры 95°C – 10 минут;
 - Cycling/Циклирование 95°C – 15 с, 58°C – 60 с - Детекция, Cycle repeats/Цикл повторить – 40 times/раз.
- Флюоресценцию измерять при 58°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»/«Закреть».

- 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**.

IV АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1 Анализ результатов амплификации специфического участка ДНК вируса африканской чумы свиней на приборе 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 подъем.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 4.

таблица 4

Название образца	Сигнал по каналу Fam	Комментарии к результатам
ОКВ	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус АЧС, результат исследования достоверен
ОК	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус АЧС, результат исследования достоверен
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	В образце находится вирус АЧС. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В образце отсутствует вирус АЧС. Образец считать отрицательным.
ПКВ АЧС	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует генетический материал вируса АЧС, результат исследования достоверен
ПК АЧС	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует генетический материал вируса АЧС, результат исследования достоверен

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных 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 ДНК, а также принять меры для ликвидации контаминации.

4.2 Анализ результатов амплификации специфического участка ДНК вируса африканской чумы свиней на приборе «Rotor-Gene» 3000/6000.

- 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 5.

таблица 5

Название образца	Сигнал по каналу Fam	Комментарии к результатам
ОКВ	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус АЧС, результат исследования достоверен
ОК	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует вирус АЧС, результат исследования достоверен
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	В образце находится вирус АЧС. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует, или $Ct \geq 35$	В образце отсутствует вирус АЧС. Образец считать отрицательным.
ПКВ АЧС	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует генетический материал вируса АЧС, результат исследования достоверен
ПК АЧС	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует генетический материал вируса АЧС, результат исследования достоверен

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей, согласно таблице 5. 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 ДНК, а также принять меры для ликвидации контаминации.

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.

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