УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
_____А.В. Кривонос
«15» июня 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы для обнаружения вируса гриппа А подтипа Н5 методом ПЦР в реальном времени

(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения вируса гриппа А подтипа Н5 методом ПЦР 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	Деионизованная вода	2,0 мл	1 пробирка
Набор II - для выявления РНК вируса гриппа А подтипа Н5 методом ПЦР в реальном времени			
1	Taq-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	MMLV-ревертаза+ ингибитор РНКаз	0,038 мл	1 пробирка
3	Положительный контроль Н5	0,2 мл	5 пробирок
4	Праймеры для ПЦР Н5	0,27 мл	1 пробирка
5	Зонд Н5	0,06 мл	1 пробирка
6	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для обнаружения вируса гриппа А подтипа Н5 методом ПЦР в реальном времени в инфицированных клеточных культурах, комбикормах, материале от животных и птиц (кровь, сыворотка крови, лимфоузлы, фрагменты селезенки, трахеи, легких, носоглоточные смывы, помет птиц, яйца и эмбрионы птиц).

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, наименование организации-производителя и/или товарный знак, полное наименование тест-системы, номер серии и контроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), предупредительная надпись «Для ветеринарного применения», количество анализов и обозначение ТУ. В каждую коробку вложена инструкция по применению тест-системы.

1.4 **Условия хранения и транспортирования**

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

Транспортирование Набора I проводить при температуре от 2°С до 25°С. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разукомплектовать 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 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 гриппа А подтипа H5. К зонду присоединены два химических соединения или две молекулы: флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции (FAM-BHQ соответственно).

2.2 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 происходит в закрытой пробирке, т. е. полностью исключается контаминация продуктами ПЦР.

2.3 Анализ по определению вируса гриппа А подтипа H5 методом ПЦР в реальном времени включает выделение суммарной РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента методом ПЦР в реальном времени.

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.

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

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.).

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°С до 8°С 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°С до 8°С не более 5 суток, при температуре от минус 18°С до минус 20°С 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.

• **НОСОГЛОТОЧНЫЕ 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°С до 8°С не более 3 суток, при температуре от минус 18°С до минус 20°С 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 трахеи, легких, лимфоузлов, селезенки, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2°С до 8°С не более 3 суток, при температуре от минус 18°С до минус 20°С 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.

• **ПОМЕТ ПТИЦ:** отобрать стерильными инструментами пробу помета. Приготовить 10% суспензию в физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе, тщательно ресуспендировать, дать отстояться в течение 10 мин. Надосадок перенести в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл и центрифугировать в течение 1 мин при максимальном количестве оборотов. Для выделения РНК использовать 200 мкл надосадочной жидкости, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

• **ЯЙЦА ПТИЦ:** до исследования хранить при температуре от 2°С до 6°С не более 5 суток. Для отбора пробы в скорлупе яйца проколоть отверстие стерильной иглой с шприцем и отобрать яичный белок. Для выделения РНК использовать 200 мкл яичного белка, помещенного в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

• **ЭМБРИОНЫ ПТИЦ (инкубационные яйца):** до исследования хранить при температуре от 2°С до 6°С не более 5 суток. Для отбора пробы в скорлупе проколоть отверстие стерильной иглой со шприцем и отобрать аллантоисную жидкость. Для выделения РНК использовать 200 мкл аллантоисной жидкости, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

• **КОМБИКОРМА:** пробу комбикорма тщательно гомогенизировать. Приготовить 10% суспензию в физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе, тщательно ресуспендировать, дать отстояться в течение 10 мин. Надосадок перенести в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и центрифугировать в течение 1 мин при максимальном количестве оборотов. Для выделения РНК использовать 200 мкл надосадочной жидкости, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

• **КОНТРОЛИ: использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения РНК** (п. 3.2). Рекомендуется использовать один положительный и один отрицательный контроли на каждые 8 исследуемых проб. Положительным контролем является генно-инженерный препарат, содержащий фрагмент гена гемагглютинина H5. Пробирку с положительным контролем размораживать непосредственно перед использованием, повторной заморозке не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл положительного контроля H5. В каче-

стве отрицательного контроля использовать 200 мкл деионизованной воды. **Положительные контроли хранить при температуре от минус 18°С до минус 20°С, размораживать непосредственно перед использованием.**

3.2 **Выделение 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°С до 65°С 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 Н5.

- Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”.
- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2°С), 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 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±2)°С, 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 сушить в течение 10 минут при 56°С, 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°С 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 (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°С не более 15 минут.**

• При необходимости длительного хранения, следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные маркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные РНК-пробы заморозить при температуре от минус 18°С до минус 20°С 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 гриппа А подтипа Н5 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 Taq-полимеразы и MMLV-ревертазы + ингибитор РНКаз,** 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). Taq-полимеразу и MMLV-ревертазу+ингибитор РНКаз 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 х (n+1)
Праймеры для ПЦР Н5	4,5	4,5 х (n+1)
Зонд Н5	1,0	1,0 х (n+1)
Taq-полимераза	0,25	0,25 х (n+1)
MMLV-ревертаза + ингибитор РНКаз	0,625	0,625 х (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 Н5 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 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 пунк-

те **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 вируса гриппа А подтипа Н5. Для этого выставить температурно-временные параметры, указанные в таблице 3.

Таблица 3

№ блока	Температура, °С	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 °C – 30 мин
2. Hold2/Удерж. темп-ры2	95 °C - 5 мин
3. Cycling/Циклирование	95 °C - 15 с
	50 °C - 15 с
	72 °C – 30 с
	Cycle repeats – 5 times/раз
4. Cycling2/Циклирование2	95 °C - 15 с
	50 °C - 15 с – Детекция флуоресценции
	72 °C – 30 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/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 – 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 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 (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 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 как описано в пункте 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 **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 подъём.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 5.

Таблица 5

Название образца	**Сигнал по каналу Fam**	**Комментарии к результатам**
К-	отсутствует, или Ct≥35	В отрицательном контроле отсутствует вирус гриппа А подтипа Н5.
Образец 1	присутствует, Ct ≤34	В образце находится вирус гриппа А подтипа Н5. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует, или Ct≥35	В образце отсутствует вирус гриппа А подтипа Н5. Образец считать отрицательным.
К+	присутствует, Ct ≤34	В положительном контроле присутствует фрагмент гена гемагглютинина Н5 вируса гриппа А.

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей, согласно таблице 5. В случае появления в отрицательном контроле значения Ct ≤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 CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.03**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

4.2.6 Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 6.

Таблица 6

Название образца	**Сигнал по каналу Fam**	**Комментарии к результатам**
К-	отсутствует, или Ct≥35	В отрицательном контроле отсутствует вирус гриппа А подтипа Н5
Образец 1	присутствует, Ct ≤34	В образце находится вирус гриппа А подтипа Н5. Образец считать положительным.
Образец 2	отсутствует, или Ct≥35	В образце отсутствует вирус гриппа А подтипа Н5. Образец считать отрицательным.
К+	присутствует, Ct ≤34	В положительном контроле присутствует фрагмент гена геммаглютинина Н5 вируса гриппа А.

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей, согласно таблице 6. В случае появления в отрицательном контроле значения Ct ≤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 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

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
_____А.В. Кривонос
« 15 » июня 2018 г.

ИЗВЕЩЕНИЕ № 3
об изменении ТУ 9388-003-42418073-05

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА H5 МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ