

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия  
человека (ФБУН ЦНИИ  
Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.В. Малеев

«09» Октября 2017 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

### по применению тест-системы «SBV» для выявления РНК вируса Шмалленберг методом полимеразной цепной реакции

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «SBV» предназначена для выявления РНК вируса Шмалленберг (*Schmallenberg virus*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

#### ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления РНК вируса Шмалленберг (*Schmallenberg virus*) основан на экстракции РНК из биологического материала совместно с РНК **экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО)**, проведении реакции обратной транскрипции РНК, амплификации полученной кДНК и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени». Результат амплификации кДНК **вируса Шмалленберг** регистрируется по каналу для флуорофора **JOE**, результат амплификации кДНК **экзогенного ВКО** регистрируется по каналу для флуорофора **FAM**. Использование экзогенного ВКО позволяет контролировать основные этапы ПЦР-анализа (экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК).

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, limit of detection, LOD)

Таблица 1

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл <sup>1</sup>
кровь (50 мкл), сыворотка крови (100 мкл), околоплодная жидкость (50 мкл), суспензии тканей и органов (50 мкл), суспензии мокрецов, комаров (100 мкл)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 <sup>3</sup> ГЭ/мл

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Порядок отбора и подготовки проб».

### Аналитическая специфичность

Отсутствуют неспецифические реакции при тестировании образцов геномной ДНК КРС, МРС, комаров родов *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* и следующих микроорганизмов: *Bovine adenovirus*; *Bovine coronavirus*; *Bovine herpes virus 1*; *Bovine leukemia virus*; *Bovine parainfluenza virus 3*; *Bovine respiratory syncytial virus*; *Bovine viral diarrhoea virus 1*, *Bovine viral diarrhoea virus 2*; *Rotavirus*; *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*; *Campylobacter jejuni*; *Clostridium perfringens*; *Chlamydophila abortus*; *Chlamydophila pecorum*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis*; *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*; *Pasterella multocida*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella Dublin*; *Shigella flexneri*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

<sup>1</sup> Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала.

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

### Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

## СОСТАВ

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F** – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК *Schmallenberg virus* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT <i>Schmallenberg virus</i>	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Schmallenberg virus</i> / STI	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87-rec	0,12	5 пробирок

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

Реагенты «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения

(см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ**

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

**ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром<sup>2</sup>. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники)

---

<sup>2</sup> Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Экстракция РНК из исследуемых образцов**

1. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп».
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

### **Обратная транскрипция и амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
  - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
  - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000

(Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ/ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)) или другие, рекомендованные Изготовителем.

8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

## **ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ**

Материалом для исследования служат клинический и патологический материал от крупного и мелкого рогатого скота, комары, мокрецы.

От животных с клиническими признаками для исследования используют цельную кровь или сыворотку крови.

От павших животных, новорожденных животных с пороками развития и мертворожденных плодов исследуют околоплодную жидкость, тканевой (аутопсийный) материал (головной мозг, спинной мозг, плацента, пуповина).

### **Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала**

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Взятие крови проводится в стерильные пробирки с 3 %-ным раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Взятие крови для получения сыворотки проводится в пробирку без антикоагулянта.

Тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты органов) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Околоплодную жидкость берут в объеме не менее 1 мл в стерильные пробирки.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение образцов цельной крови при температуре от 2 до 8 °С – не более 48 часов. Замораживание цельной крови не допускается. Допускается хранение остальных видов материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
  - при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение месяца,
  - при температуре не выше минус 68 °С – длительно.
- Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

### **Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК**

Образцы цельной крови, околоплодной жидкости не требуют предварительной подготовки. Для экстракции РНК используют 50 мкл цельной крови или околоплодной жидкости.

Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (если кровь стояла при температуре от 2 до 8 °С более 1 ч после ее забора, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Переносят плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Для экстракции РНК используют 100 мкл плазмы.

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Для экстракции РНК используют 100 мкл сыворотки.

Тканевой материал объемом 0,2-0,3 см<sup>3</sup> (200-300 мкл) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят ~10 % (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин и 100 мкл верхней фазы суспензии используют для экстракции РНК. Допускается хранение гомогенатов при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 месяца.

Мокрецов и комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 особь – 30 мкл раствора с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора. Предварительно из насекомых формируют пулы (не более 50 особей). При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие



параметры для гомогенизации: диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 5 мин; объем буфера – 700 мкл (пул из 25 особей), 1000-1500 мкл (пул из 50 особей). Полученные суспензии центрифугируют при 10 000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf, Германия) в течение 1 мин. Для экстракции РНК используют 100 мкл надосадочной жидкости.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

### **Экстракция РНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп»**

**Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции).

Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-rec** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-rec** внести по **50-100 мкл проб** (в зависимости от исследуемого материала), используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.

Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.

Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

**Проведение ОТ-ПЦР и детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени»**

**Общий объем реакции – 25 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл.**

**А. Подготовка проб для амплификации**

Пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1-FRT *Schmallenberg virus*** разморозить, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Schmallenberg virus*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FER/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и RT-G-mix-2 из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *Schmallenberg virus*;
- 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FER/FRT;
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF);
- 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv);
- 0,25 мкл RT-G-mix-2.

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Schmallenberg virus* / STI.

## **Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»**

Запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 2.

## **ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** РНК вируса Шмалленберг, если для данной пробы значение *Ct* по каналу для флуорофора JOE

менее 37.

В образце **не обнаружена** РНК вируса Шмалленберг, если для данной пробы по каналу для флуорофора JOE значение  $C_t$  отсутствует (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу для флуорофора FAM определено значение  $C_t$ , не превышающее 33.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора JOE получено значение  $C_t$  больше 37, а значение  $C_t$  по каналу для флуорофора FAM не превышает 33. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК, и считать, что в образце обнаружена РНК вируса Шмалленберг при получении аналогичного результата.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла ( $C_t$ ) не определено (отсутствует) или превышает 37, и по каналу для флуорофора FAM значение  $C_t$  также не определено (отсутствует) или превышает 33. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК.

**Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК (см. таблицу 2).**

### **Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования**

Таблица 2

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
OK	Экстракция РНК	$\leq 33$	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	$\leq 30$	$\leq 30$

#### **Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 2, необходимо повторить амплификацию для всех

образцов, в которых не обнаружена РНК вируса Шмалленберг.

2. Для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) по каналу для флуорофора JOE и/или для отрицательного контроля ПЦР (К-) на любом из каналов определено значение порогового цикла (*C<sub>t</sub>*). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК вируса Шмалленберг, начиная с этапа экстракции РНК.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 12 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

**Транспортирование.** Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *Schmallenberg virus*, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, ТМ-ревертазы (MMIv), RT-G-mix-2, полимеразы (TaqF). ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Schmallenberg virus*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-Реввертазу (MMIv) и RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Schmallenberg virus* хранить в защищенном от света месте.

## **ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ**

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям,

указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «SBV» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru<sup>3</sup>.

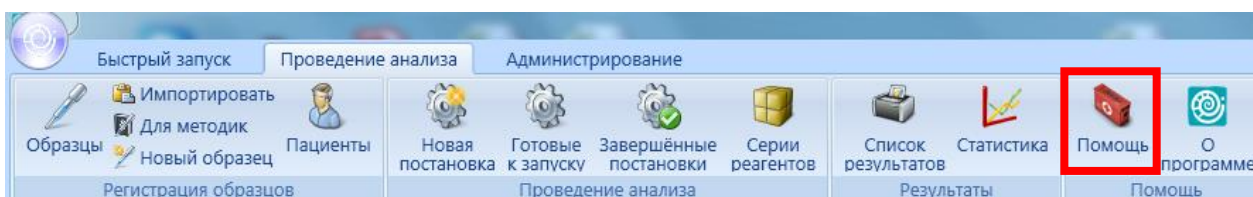
---

<sup>3</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия)

**ВНИМАНИЕ!** Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически, с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 (Rotor-Gene Q) / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

#### А. Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

**ВНИМАНИЕ!** Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- 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  $\mu$ l oil layer volume/15  $\mu$ L объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

#### Программа SBV

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	50	30 мин	–	1
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	40
	55	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	



- 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 обоих каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. 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 этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

## **Б. Анализ результатов**

Анализ полученных результатов можно проводить вручную, с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме, с использованием программного обеспечения FRT Manager.

### **Анализ результатов амплификации кДНК ВКО (канал FAM/Green):**

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- 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**.
- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение**

**выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.

- 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**).
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.  
В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

### **Анализ результатов амплификации специфического участка кДНК вируса Шмалленберг (канал JOE/Yellow):**

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- 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**.
- 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**).
- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.1**.  
В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

#### А. Проведение ОТ-ПЦР амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
- Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением «.pts») и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованную ранее схему планшета, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением «.pts») и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

Задать программу амплификации.

### Программа SBV

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5
	60	25 с	–	
	72	25 с	–	
4	95	10 с	–	40
	55	25 с	FAM, JOE	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (SBV.tmo) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Запустить выполнение выбранной программы **SBV** с заданной схемой планшета.

- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.
- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для

- измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
  - После окончания программы приступить к анализу результатов.

## **Б. Анализ результатов**

### **Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM):**

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на

клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

### Анализ результатов амплификации специфического участка кДНК вируса Шмалленберг (канал JOE):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**, отключив кнопку **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

### СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель