

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест *B.abortus/B.melitensis/B.ovis/B.suis*»
Комплектация 1

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест *B.abortus/B.melitensis/B.ovis/B.suis*» предназначена для выявления генетического материала бактерий *Brucella spp.* и идентификации *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* и *Brucella suis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест *B.abortus/B.melitensis/B.ovis/B.suis*» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР.

Тест-система подходит только для анализа образцов одиночных штаммов.

Тест-система содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предыдущих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест *B.abortus/B.melitensis/B.ovis/B.suis*» используется быстрый протокол амплификации, который позволяет за 60 – 80 мин получить достоверные результаты исследования, что существенно повышает точность лабораторных анализов. За счет использования идентичных и простых протоколов тест-систем серии «АртТест» значительно снижен риск ошибки оператора на всех этапах работы.

Комплектации тест-системы указаны в таблице 1.

Таблица 1. Состав тест-системы «АртТест *B.abortus/B.melitensis/B.ovis/B.suis*»

Компонент	Объем, не менее	
	50 исследований	100 исследований
1. ПЦР-реагент	0,5 мл	1,0 мл
2. Праймеры BRU4	0,5 мл	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл	1,0 мл
5. ВКО	1,0 мл	1,0 мл

Для этапа экстракции ДНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Вет», «АртМагнит Вет», «АртНК Экстракт».

Результат амплификации экзогенного внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации ДНК *Brucella spp.* регистрируется на канале HEX/VIC/Yellow; ДНК *Brucella melitensis* – на каналах HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange и Cy5.5/Crimson; ДНК *Brucella abortus* – на каналах HEX/VIC/Yellow, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson; ДНК *Brucella ovis* – на каналах HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red; ДНК *Brucella suis* – на каналах HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
- ПЦР-бокс;
- центрифуга/вортекс;
- набор дозаторов переменного объема;
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
- оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение ДНК из биологического материала производится совместно с ВКО (10 мкл на выделение) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя реагентов для очистки ДНК.

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов. Допускается округление значений в большую сторону.

II. Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

III. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл ДНК исследуемых образцов.

IV. Поставить контрольные реакции амплификации:

- 1) К- – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ;
- 2) К+ – внести в пробирку 10 мкл ПКЭ;
- 3) ОКЭ – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

IV. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор*.

* Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору:

а) для приборов типа «Rotor-Gene» *:

– установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 10%. При необходимости порог

фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96»*:

– установить значение параметра пороговой линии («Single Threshold») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 – 250**;

– при необходимости допускается активация функций «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit».

в) для приборов «ДТ-96»*:

– установить «Метод» – «Геометрический (Ср)»;

– установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0 – 30%. **

г) для приборов типа «QuantStudio»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**.

* В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.

** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «С_т» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям – анализ необходимо переделать, начиная со стадии экстракции ДНК.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «С _т » по каналу	
		FAM/Green	HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red Cy5.5/Crimson
ОКЭ	Экстракция ДНК	+	–
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	+	+

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	Значение «С _т » по каналу				
	FAM/Green	HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
Положительный <i>B. spp</i>	+/-	Ct <30	–	–	–
Положительный <i>B. melitensis</i>	+/-	Ct <30	+	–	+
Положительный <i>B. abortus</i>	+/-	Ct <30	–	+	+
Положительный <i>B. ovis</i>	+/-	Ct <30	+	+	–
Положительный <i>B. suis</i>	+/-	Ct <30	+	+	+
Отрицательный	+	–	–	–	–
Невалидный	–	–	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «С_т», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «С_т», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение «С_т» для данного канала не анализируется

Образец считается положительным по:

- *Brucella spp.*, если Ct <30 по каналу **HEX/VIC/Yellow**;
- *Brucella melitensis*, если Ct <30 по каналу **HEX/VIC/Yellow** и значение Ct по каналам **ROX/Orange** и **Cy5.5/Crimson** пересекает пороговую линию;
- *Brucella abortus*, если Ct <30 по каналу **HEX/VIC/Yellow** и значение Ct по каналам **Cy5/Red** и **Cy5.5/Crimson** пересекает пороговую линию;
- *Brucella ovis*, если Ct <30 по каналу **HEX/VIC/Yellow** и значение Ct по каналам **ROX/Orange** и **Cy5/Red** пересекает пороговую линию;
- *Brucella suis*, если Ct <30 по каналу **HEX/VIC/Yellow** и значение Ct по каналам **ROX/Orange**, **Cy5/Red** и **Cy5.5/Crimson** пересекает пороговую линию.

В случае невалидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции НК или со стадии забора материала.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Транспортировка тест-системы осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше +37°C (до 5 суток) или при температуре +2 – +8 °C (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °C до -16 °C. Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «*AptTectm B.abortus/B.melitensis/B.ovis/B.suis*» – 12 месяцев с даты изготовления.

ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Использование неподходящих расходных материалов	используйте пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	ПЦР ингибирование	разведите образец в 5 раз в воде, повторите анализ
		используйте новый образец материала
		используйте сорбентный метод выделения ДНК
Нет сигнала в K+	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	аккуратно приготовьте новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установите параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	используйте наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала по каналам возбудителей в K- и/или ОКЭ	Контаминация	проведите деконтаминационные процедуры; используйте новые наборы