

## МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Тест-системы «АртТест Ауески»

#### Комплектация 1

### НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест Ауески» предназначена для выявления генетического материала вируса болезни Ауески (*Suid herpesvirus 1*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

### ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест Ауески» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР.

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 Ауески» используется быстрый протокол амплификации, который позволяет за 60 – 80 мин получить достоверные результаты исследования, что существенно повышает поточность 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 Ауески»**

| Компонент          | Объем, не менее |                  |
|--------------------|-----------------|------------------|
|                    | 50 исследований | 100 исследований |
| 1. ПЦР-реагент     | 0,5 мл          | 1,0 мл           |
| 2. Праймеры Ауески | 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 возбудителя регистрируется на канале HEX/VIC/Yellow.

### 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»:

$$10 \cdot (N+1) \text{ мкл ПЦР-реагента} + 10 \cdot (N+1) \text{ мкл праймеров}$$

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 ОКО;
- 2) К+ – внести в пробирку 10 мкл ПКО;
- 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 | 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 эксперимента 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 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimization Before 1<sup>st</sup> 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 «Ct» 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 «Ct» по каналу FAM/Green | Значение «Ct» по каналу HEX/VIC/Yellow |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|
| 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 «Ct» по каналу FAM/Green | Значение «Ct» по каналу HEX/VIC/Yellow |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|
| Положительный     | +/-                               | +                                      |
| Отрицательный     | +                                 | –                                      |
| Невалидный        | –                                 | –                                      |

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

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

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

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 «АртТест Ауески» – 12 месяцев с даты изготовления.

### ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

| Проблема                                                       | Возможная причина                               | Варианты решения проблемы                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Нет сигнала по каналу FAM/Green</b>                         | 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                                                                                                 |
| <b>Нет сигнала в K+</b>                                        | 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                                                                                |
| <b>Наличие сигнала по каналу HEX/VIC/Yellow в K- и/или ОКЭ</b> | Контаминация                                    | проведите деконтаминационные процедуры; используйте новые наборы                                                                           |