

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы «АртТест Вирусная диарея КРС»

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест Вирусная диарея КРС» предназначена для выявления РНК вируса рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* в биологическом материале и кормах для животных методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени».

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест Вирусная диарея КРС» является высокочувствительным набором для выявления РНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов в реакции ОТ-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 Вирусная диарея КРС» используется быстрый протокол амплификации, который позволяет за 80 – 90 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 рассчитаны на проведение 50 и 100 исследований (таблица 1).

Таблица 1. Состав тест-системы «АртТест Вирусная диарея КРС»

Компонент	Объем, не менее	
	50 исследований	100 исследований
1. ОТ-ПЦР-реагент	0,25 мл	0,5 мл
2. Праймеры ВД	0,75 мл	1,5 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 РНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртНК экстракт», «АртМагнит Вет».

Результат амплификации внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации РНК возбудителя регистрируется на канале HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной ПЦР-диагностики.

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°C до +8°C с морозильной камерой от -24°C до -16°C;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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»:

5*(N+1) мкл ОТ-ПЦР-реагента + 15*(N+1) мкл праймеров

Где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

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

III. В подготовленные пробирки добавить по 5 мкл РНК исследуемых образцов.

IV. Поставить контрольные реакции амплификации:

- 1) К- – внести в пробирку 5 мкл ОКЭ;
- 2) К+ – внести в пробирку 5 мкл ПКЭ;
- 3) ОКЭ – внести в пробирку 5 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
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам FAM/Green, HEX/VIC/Yellow	60	15 сек	
Элонгация	67	15 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 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для всех 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.

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 РНК	+	–
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов начиная со стадии экстракции РНК.

В случае несоответствия контрольных точек К- и К+ необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки 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	–	–

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

«+» 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 РНК 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 Вирусная диарея КРС» – 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
	Некачественно отобранный клинический материал	провести повторный забор клинического материала
	ПЦР ингибирование	разведите образец в 5 раз в воде, свободной от РНКаз и повторите анализ.
		используйте новый образец материала используйте другой метод выделения РНК
Нет сигнала в К+	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 каналу HEX/VIC/Yellow в К- и/или ОКЭ	Контаминация	проведите деконтаминационные процедуры; используйте новые наборы