

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы «АртТест КЧС»

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест КЧС» предназначена для выявления РНК вируса рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* в биологическом материале и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) совмещенной с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР).

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Лимит детекции тест-системы составляет не менее 10 копий РНК 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 КЧС» используется быстрый протокол амплификации, который позволяет за 80 – 90 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 набора «АртТест КЧС»

Компонент	Объем, не менее	
	50 исследований	100 исследований
1. ОТ-ПЦР-реагент	0,25 мл	0,5 мл
2. Праймеры КЧС	0,5 мл	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл	1,0 мл
5. ВКО-Р	1,0 мл	1,0 мл

Для этапа экстракции РНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртМагнит Вет» или «АртМагнит РНК».

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

ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Метод обнаружения РНК вируса основан на экстракции общей РНК из биологического материала совместно с ВКО, проведении реакции обратной транскрипции с последующей амплификацией полученной кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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 РНК. Производится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения РНК. ВКО-Р вносят в количестве 10 мкл на каждые 100 мкл образца.

Подготовка ПЦР-смеси

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

I. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «Мастер Микс»:

5*(N+1) мкл ОТ-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 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

III. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл РНК 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 (отрицательный контроль экстракции) – 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, °С	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	15 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 окончанию, если это позволяет ПО 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») – 5%. 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 – 500**;

– 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 «Ст» 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 «Ст» по каналу FAM/Green	Значение «Ст» по каналу HEX/VIC/Yellow
ОКЭ	Экстракция РНК	+	–
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	+	+

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

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

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	Значение «Ст» по каналу FAM/Green	Значение «Ст» по каналу HEX/VIC/Yellow
Положительный	+/-	+
Отрицательный	+	–
Невалидный	–	–

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

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

«+/-» – значение «Ст» 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 °С (до 5 суток) или при температуре +2 – 8 °С (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 °С до -16 °С.

Допускается хранение всех компонентов набора при температуре +2 – +8 °С в течение 90 дней. Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест КЧС» – 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
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 каналу HEX/VIC/Yellow в K- и/или ОКЭ	Контаминация	проведите деконтаминационные процедуры; используйте новые наборы