

ИНСТРУКЦИЯ по применению

Набор реагентов «ВетЭК-ПЦР-CDV» для качественного выявления РНК чумы собак методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ВетЭК-ПЦР-CDV» для выявления РНК чумы собак (чума плотоядных, болезнь Карпе, Canine Distemper) в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Гибридизационно-флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» означает, что в составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Результаты амплификации регистрируются в течение всего процесса по каналам FAM и HEX флуоресцентной детекции

Метод выявления РНК вируса чумы собак основан на экстракции РНК из образцов исследуемого материала. Без внесения внутреннего контрольного образца (ВКО). Внутренний контрольный образец в данном наборе является **эндогенным** и представляет собой ген клетки животного. Наличие эндогенного ВКО позволяет контролировать качество отбора, транспортировки и хранения исследуемого образца, проведение лизиса клетки, денатурации белков, амплификацию.

Принцип эндогенного ВКО заключается в том, что он находится внутри клетки животного, также как и сам вирус. И проходит все этапы манипуляций работы с образцом. Поэтому при наличии эндогенного ВКО более правильно оцениваются результаты ПЦР анализа.

Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала нуклеиновой кислоты клетки животного, а соответственно, что биообразец был отобран правильно, сохранность его и процесс экстракции проведены качественно.

Набор адаптирован для работы на зарегистрированных в Российской Федерации амплификаторах планшетного и роторного типов: «CFX96» («Bio-Rad Laboratories Inc.»); «ДТ 96», «ДТ Лайт» (ООО «НПО ДНК-Технология»);

Н ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Комплект 1: «ПЦР-комплект» вариант 50 П

Комплект 1 предназначен для проведения амплификации РНК вируса чумы собак. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК.

Набор рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные образцы.

Таблица 1. Состав тест-системы Комплект 1:

Компонент	Объем
1. Смесь -1	1 пробирка-0,250 мл
2. Смесь-2	1 пробирка-0,750 мл
3.ПКО	1 пробирка -0,05 мл
4.К-	1 пробирка- 0,05 мл

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования на вирус чумы собак служат мазки с конъюнктивы, мазки со слизистой носовой полости, цельная кровь, плазма крови, сыворотка крови, фекалии или ректальный мазок.

Взятие крови проводится в стерильные пробирки с 3% раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта из расчета 10:1

Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Взятие крови для получения сыворотки проводится в пробирку без антикоагулянта.

Мазки со слизистой носовой полости, ректальные мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора. Конец зонда отламывают, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают. Мазки с конъюнктивы берут стерильными зондами с ватными тампонами. После взятия материала рабочую часть зонда с ватным тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 300 мкл стерильного физиологического раствора. Конец зонда отламывают, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Фекалии 1-5 г помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы мазков с конъюнктивы, со слизистых носоглотки и прямой кишки, не требуют предварительной подготовки.

Из фекалий готовят ~10 % (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию фекалий или ректальный мазок центрифугируют при 10-12 тыс об/мин в течение 2 мин.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК можно проводить любым коммерческим набором для выделения нуклеиновых кислот на основе сорбции и преципитации, согласно инструкции по применению.

НЕОБХОДИМЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. Бокс биологической безопасности класса защиты ПА;
2. Амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени» (например, CFX96, DT-96, QuantStudio 5; Rotor Gene Q);

3. Оптические пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
4. Мини-центрифуга-вортекс;
5. Набор дозаторов переменного объема (1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл);
6. Одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема*;
7. Одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл*;
8. Штативы для пробирок и наконечников;
9. Холодильник от +2 °С до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки;
11. Ёмкость для сброса наконечников;
12. Комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПОДГОТОВКА ПЦР-СМЕСИ

1. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) должны входить 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-) и положительный контроль ПЦР (ПКО).
3. В пробирке объемом 1,5–2 мл приготовить «Мастер Микс»: 15*(N+1) мкл Смеси-2 + 5*(N+1) мкл Смеси-1 где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

4. Перемешать «Мастер Микс» на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.
5. В подготовленные пробирки добавить по 5 мкл исследуемых мазков.
6. Поставить контрольные реакции амплификации:
отрицательный контроль – внести в пробирку 5 мкл К-;
положительный контроль – внести в пробирку 5 мкл ПКО.
7. Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки/стриппы в амплификатор и запустить прибор со следующими параметрами амплификации*:

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	50	10 мин	1
2	95	2 мин	1
3	95	5 сек	5
	60	15 сек	
	67	15 сек	
	95	5 сек	
4	60	15 сек	40
	67	15 сек	

по каналам: FAM/Green, HEX/Yellow детекция			
---	--	--	--

* 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 «MaxReading/Максим. Сигнал» – 10Fl.

**На амплификаторе Quant Studio 5 во вкладке «Plate» - «Advanced Setup» в качестве канала детекции необходимо выбрать VIC (соответствует каналу HEX по длинам волн флуоресценции).

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Флуоресцентный сигнал амплификации специфического фрагмента вируса чумы собак регистрируется по каналу HEX, флуоресцентный сигнал амплификации внутреннего контроля (ВКО) регистрируется по каналу FAM.

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 для канала HEX («Threshold/Порог») – **0,05**

При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,05–0,1;

– установить значение параметра пороговой линии для канала FAM («Threshold/Порог») – **0,05**

При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,05–0,1;

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

б) для приборов «Bio-Rad CFX96», «ДТ-96»:

– установить значение параметра пороговой линии для канала HEX («Single Threshold») – **50**

При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 50–150;

– установить значение параметра пороговой линии для канала FAM («Single Threshold») – **50**

При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 50–150;

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

На приборе «ДТ-96» в окне «настройки» выбрать «экспозиция измерения» и выставить 1500 для каналов FAM и HEX.

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/Yellow
К-	ПЦР	Не детектируется	Не детектируется
ПКО	ПЦР	≤ 35	≤ 35

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

Таблица 4. Таблица интерпретации результатов образцов

Результат образца	Значение «Ст» по каналу FAM/Green (ВКО)	Значение «Ст» по каналу HEX/Yellow (CDV)
Положительный	+/-	< 38
Отрицательный	≤ 38	> 38 или отсутствует
Не валидный	Не детектируется	> 38 или Не детектируется

+/- - значение «Ст» для данного канала либо «+» либо «-»

В случае не валидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции образца клинического материала или со стадии забора материала у животного.

Повторный не валидный результат свидетельствует о некачественном отборе клинического материала и требует дополнительного анализа, начиная с этапа отбора клинического материала.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов «ВетЭК-ПЦР-CDV» – **12 месяцев** с даты изготовления. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение наборов должно осуществляться в упаковке предприятия изготовителя при температуре от **-24 °С до -16 °С** в течение всего срока годности.

Транспортирование наборов «ВетЭК-ПЦР-CDV» осуществляется при температуре от **2 до 8 °С** не более **суток**

Отзывы и предложения о продукции вы можете оставить по адресу Jigon@mail.ru