

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

Набор реагентов «ВетЭК-ПЦР-FeLV» для качественного выявления ДНК провируса лейкоза кошек методом ПЦР в режиме реального времени

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ВетЭК-ПЦР-FeLV» для выявления ДНК провируса лейкоза кошек (FeLV) в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

FeLV — это крайне опасный вирус, который поражает иммунную систему кошек.

Данное заболевание в итоге может привести к смерти, так как организм, заражённый вирусной лейкемией, теряет сопротивляемость инфекции, из-за чего очень быстро прогрессируют опухолевые процессы, развиваются анемии.

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 провирусной ДНК вируса лейкоза основан на экстракции ДНК 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 и 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»);

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Комплект 1: «ПЦР-комплект» вариант 50 П

Комплект 1 предназначен для проведения амплификации провирусной ДНК лейкоза кошек. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

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 служит цельная кровь. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Взятие крови проводится в стерильные пробирки с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. Материал доставляют в лабораторию в день взятия, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение образцов цельной крови при температуре от 2 до 8 °С – не более 48 часов, замораживание цельный крови не допускается. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК Образцы цельной крови не требуют предварительной подготовки.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК 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, ДТ-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

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»: $15 \cdot (N+1)$ мкл Смеси-2 + $5 \cdot (N+1)$ 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

по каналам: FAM/Green, HEX/Yellow детекция	67	15 сек	
---	----	--------	--

* 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 длине волн флуоресценции).

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Флуоресцентный сигнал амплификации специфического фрагмента парвовируса 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

В случае несоответствия контрольных точек К- и ПКО необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР. 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 (FeLV)
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-FeLV» – **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-FeLV» осуществляется при температуре от **2 до 8 °С** не более **суток**

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