ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «ГенТест Ринотрахеит КРС»

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «ГенТест Ринотрахеит КРС» предназначена для выявления ДНК бычьего герпесвируса (*Bovine herpesvirus 1, BoHV-1*) в биологическом материале и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «ГенТест Ринотрахеит КРС» является высокочувствительной тест-системой для выявления ДНК *BoHV-1*: 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 «ГенТест Ринотрахеит КРС» используется быстрый протокол амплификации, который позволяет за 75–85 мин получить достоверные результаты исследования, что существенно повышает поточность лабораторных анализов. За счет использования идентичных и простых протоколов тест-систем серии «ГенТест» значительно снижен риск ошибки оператора на всех этапах работы.

Опционально тест-система «ГенТест Ринотрахеит КРС» позволяет пользователю проводить количественный анализ патогена и анализировать качество отбора образца[1].

Комплектации тест-системы рассчитаны на проведение 55 и 110 исследований (таблица 1).

Таблица 1. Состав тест-системы «ГенТест Ринотрахеит КРС»[2]

Компонент	Объем, не менее	
	на 55 реакций	на 110 реакций
1. ПЦР-реагент	1 пробирка – 0,55 мл	1 пробирка – 1,1 мл
2. Праймеры Ринотрахеит	1 пробирка – 0,55 мл	1 пробирка – 1,1 мл
3. ПКО-В	1 пробирка – 0,5 мл	1 пробирка – 0,5 мл
4. ОКО	1 пробирка – 1,0 мл	1 пробирка – 1,0 мл
5. ВКО[3]	1 пробирка – 0,55 мл	1 пробирка – 1,1 мл

Для этапа экстракции ДНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртРНК экстракт», «АртДНК экспресс», «АртДНК легкий».

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

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;
- оптические пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 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[4] (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 (N) 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*(N+1) мкл 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 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, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	10
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	35
Отжиг/Детекция по каналам FAM/Green, HEX/Yellow	63	10 сек[5]	
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 окончанию, 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 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*».

<u>в) для приборов «ДТ-96»*:</u>

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

<u>г) для прочих амплификаторов</u> – см. примечание[6].

** 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 HEX/Yellow	Значение «Ct» по каналу FAM/Green
ОКЭ	Экстракция ДНК	–	+
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	+	+

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

Таблица 4. Таблица интерпретации результатов образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow	Значение «Ct» по каналу FAM/Green
Положительный	+	+/–
Отрицательный	–	+
Не валидный	–	-

«–» 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 образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК с использованием сорбентного метода пробоподготовки.

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-систему хранят в упаковке изготовителя при температуре от –24 °С до +8 °С.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «ГенТест Ринотрахеит 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 оптические пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора[7]
	ПЦР ингибирование	разведите образец в 5 раз в воде, повторите анализ
		используйте новый образец материала
		используйте сорбентный метод выделения ДНК
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/Yellow в К- и/или ОКЭ	Контаминация	- проведите деконтаминационные процедуры; - используйте новые наборы

Примечания:

[1] Опциональное расширение возможностей тест-системы доступно по запросу покупателя:

для анализа качества отбора образца тест-система комплектуется праймерами, которые дополнительно идентифицируют эндогенную ДНК в образце в качестве внутреннего контроля;

при опциональном расширении возможностей, тест-система сопровождается соответствующими методическими указаниями.

[2] По согласованию с покупателем допускаются изменения комплектации тест-системы, не затрагивающие ключевые моменты анализа.

[3] По желанию покупателя ВКО может быть укомплектован в реагенты для очистки нуклеиновых кислот.

[4] В случае использования тест-системы, анализирующей лишь эндогенный ВКО – экзогенный ВКО добавлять не обязательно.

[5] На амплификаторе ДТ-96 требуется установка времени отжига/детекции 11 сек.

[6] В инструкции приведены рекомендации по наиболее распространённому оборудованию. В случае необходимости, разработчик предоставляет методические указания по работе тест-системы на амплификаторах, отличных от описанных.

[7] Для приборов Rotor-Gene допустимо использование ПЦР пробирок фирмы-производителя прибора (Qiagen, кат. номер 981005, 981008, 981103, 981106 и др.), а также адаптированный пластик (например, Axygen, кат. номер PCR-0104-C).