ЭКОлаб
производитель диагностических наборов и лекарственных препаратов

И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению
Набор реагентов «ВетЭК-ПЦР-FIV» для качественного выявления ДНК провируса иммунодефицита кошек методом ПЦР в режиме реального времени

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ВетЭК-ПЦР-FIV» для выявления ДНК провируса иммунодефицита кошек (FIV) в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
ВИК вызывает медленно прогрессирующее истощение иммунной системы, приводящее к ослаблению иммунитета организма кошки, развитию вторичных инфекционных заболеваний и гибели.

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 иммунодефицита кошек 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 находиться 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 иммунодефицита 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 IIA;
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

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	40
4	60	15 сек	

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before1st 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 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 «Ct» по каналу FAM/Green**	**Значение «Ct» 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 «Ct» по каналу FAM/Green (ВКО)**	**Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow (FIV)**
Положительный	+/-	< 38
Отрицательный	≤ 38	> 38 или отсутствует
Не валидный	Не детектируется	> 38 или Не детектируется

+/- - значение «Ct» 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-FIV» – **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-FIV » осуществляется при температуре от **2 до 8 °С** не более **суток**

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