

«ИзоТест-SBV»

Набор реагентов для обнаружения РНК вируса мешотчатого расплода (SBV) методом петлевой изотермической амплификации (RT-LAMP)

Инструкция-вкладыш

Настоящая инструкция устанавливает порядок использования набора реагентов для проведения реакции обратной транскрипции и петлевой изотермической амплификации (RT-LAMP) с целью обнаружения специфических фрагментов РНК вируса мешотчатого расплода (SBV) путем флуоресцентной детекции в режиме реального времени.

Набор реагентов позволяет выявить в одной пробирке две мишени: фрагмент РНК SBV или фрагмент ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК).

Порог обнаружения – не более 20 копий фрагментов кДНК SBV.

Набор рассчитан на проведение 60 реакций.

I Состав набора

№	Реагент	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь, PC iSBV	прозрачная жидкость	1,2 мл	1 пробирка
2.	Смесь ферментов, rSD	прозрачная бесцветная жидкость	0,06 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО кДНК SBV, 50 копий/мкл	прозрачная бесцветная жидкость	0,05 мл	1 пробирка
4.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

II Условия хранения и транспортирования, срок годности

Температура хранения - от минус 18 до минус 25 °С.

Транспортирование - при температуре от минус 16 до минус 20 °С, краткосрочное (не более суток) - при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности указан на этикетке.

III Список оборудования и расходных материалов

1. Прибор для проведения ПЦР в реальном времени.
2. Микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок 1,5 мл.
3. Микропипетки переменного объема на 20, 200 и 1000 мкл.
4. Наконечники к микропипеткам с аэрозольным барьером.
5. Микропробирки на 1,5 мл.
6. Штатив для микропробирок.
7. Пробирки или стрипованные пробирки, соответствующие оборудованию для проведения амплификации.
8. Штатив для пробирок или стрипованных пробирок для амплификации.

IV Планирование исследования

1. Проведение RT-LAMP возможно только для образцов, прошедших процедуру пробоподготовки и выделения РНК. Для выделения необходимо использовать наборы, позволяющие обеспечить качество РНК, достаточное для проведения реакции обратной транскрипции.
2. В исследование необходимо обязательно включить положительный контрольный образец (ПКО), содержащий 50 копий/мкл кДНК SBV и отрицательный контрольный образец (ОКО).
3. Объем реакционной смеси и фермента рассчитывается исходя из количества образцов для исследования: **$N+2$** , где N- количество исследуемых образцов, 2 – контроли (ПКО, ОКО).

№	Название	Объем на пробирку, мкл	Формула для расчета объема	Пример расчета объема на 6 исследуемых образцов, мкл
1	PC iSBV	19	$19 \times (N+2)$	$19 \times (6+2) = 152$
2	rSD	1	$1 \times (N+2)$	$1 \times (6+2) = 8$

V Подготовка к проведению RT-LAMP

1. Разморозить, перемешать и центрифугировать реакционную смесь **PC iSBV**.
2. Добавить в микропробирку объемом 1,5 мл рассчитанный объем **PC iSBV** и **rSD**, перемешать и центрифугировать.
3. Внести в пробирки для амплификации по **20 мкл** готовой реакционной смеси с ферментом.

4. Приготовить исследуемые образцы РНК, ПКО и ОКО, при необходимости перемешать и центрифугировать.
5. Внести в пробирки для амплификации по **5 мкл** исследуемые образцы, ПКО и ОКО, перемешать пипетированием.
6. Поместить пробирки в прибор для амплификации.

VI Режим амплификации

Провести реакцию амплификации в соответствии с инструкцией к прибору, используя рекомендуемые ниже режимы амплификации и измерения сигналов флуоресценции.

1. Режим амплификации:

Номер ступени	Температура, °C	Число повторов	Время, сек	Детекция
1	60	1	30	-
2	48	1	360	-
3	92	1	15	-
4	62	3	15	-
5	92		5	-
6	66	35	60 (50)*	+

* Время для приборов, в которых измерение сигнала флуоресценции (детекция) производится после окончания удержания температуры ступени

2. Используемые красители для детекции.

В данном наборе используются **две независимые реакции**, которые проводятся в одной пробирке одновременно. Первая реакция позволяет обнаружить фрагмент РНК или кДНК SBV, (канал детекции **ROX**), вторая реакция позволяет обнаружить фрагмент ДНК внутреннего положительного контроля (**ВПК**) (канал детекции **FAM**), исключающий ложноотрицательный результат анализа.

VII Обработка результатов работы прибора и анализ полученных данных

Обработка результатов амплификации проводится в соответствии с инструкцией к прибору. Результатом обработки результатов анализа должно быть определение значения порогового цикла. Оценка результатов проводится из расчета **один пороговый цикл – одна минута** изотермической амплификации без учета предварительных шагов.

1. Критерии оценки результатов амплификации для контрольных образцов:

- время прохождения реакции для **ПКО** должно быть в диапазоне **от 19 до 24 минут** по каналу **ROX**;
- время прохождения реакции для **ОКО** должно быть в диапазоне **от 20 до 32 минут** по каналу **FAM**;
- реакция для ОКО по каналу **ROX** должна отсутствовать.

2. Оценка результата для исследуемых образцов.

Критерием положительного результата обнаружения РНК SBV в исследуемых образцах является прохождение реакции по каналу **ROX**.

Критерием отрицательного результата обнаружения РНК SBV в исследуемых образцах является прохождение реакции по каналу **FAM**.

Отсутствие реакции по каналу **FAM** и **ROX** свидетельствует об отсутствии амплификации и получении недостоверного ложноотрицательного результата.

