




Набор реагентов для выявления ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени»

АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2060-1Z  96

Только для ветеринарных и других
немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	5
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ.....	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6.1. Взятие исследуемого материала	8
6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК	8
6.3. Экстракция НК из исследуемых образцов	9
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	9
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	10
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала	10
7.2. Подготовка материала к исследованию	11
7.3. Условия хранения материала для исследования	11
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция НК из исследуемого материала	12
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	12
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции.....	13
8.4. Анализ и обработка результатов	14
8.5. Используемые настройки амплификаторов	14
8.6. Интерпретация результатов	15
8.7. Возможные ошибки	16
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	17
9.1. Предел обнаружения	17
9.2. Аналитическая специфичность	17
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	19
10.1. Срок годности	19
10.2. Транспортирование.....	19
10.3. Хранение	19
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
К-	отрицательный контроль ПЦР
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОК	отрицательный контроль экстракции
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПК	положительный контроль
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.» (далее по тексту - набор) предназначен для качественного определения ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* в биологическом материале от животных и птиц (цельная кровь, мазки со слизистых оболочек влагалища, носовой полости, ротоглотки, конъюнктивы, смывы с препуция, ректальные мазки, мазки из клоаки (у птиц), фекалии, тканевой (аутопсийный) материал (печень, селезенка, легкие и др.) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Набор реагентов используется в ветеринарных лабораториях, осуществляющих выявление НК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae*.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Состав и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации специфических участков ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь Chl-spp	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Chl-spp	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/passport/	1
Вкладыш для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹ и одновременной амплификации участков ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО В с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО В позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участок ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* и последовательность ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ²
ДНК-мишень	ДНК микроорганизмов семейства <i>Chlamydiaceae</i>	ВКО В
Область амплификации	16S рРНК	искусственно синтезированная последовательность

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио» каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

¹ ВКО В входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала.

² Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.» применяется только для ветеринарных.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – «ВКО В», входящим в состав наборов реагентов для экстракции. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

4.6. Применение набора возможно только персоналом, обученным правилам работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования.

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (утверждены приказом руководителя Роспотребнадзора 22 декабря 2009 г.) и правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты, насадки для блендера и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения при проведении ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

- 6.1.1. Вакуумные пробирки для забора крови с ЭДТА.
- 6.1.2. Двухсторонняя игла для забора крови в вакуумную пробирку.
- 6.1.3. Сухие стерильные зонды с ватными тампонами.
- 6.1.4. Стерильные одноразовые пробирки на 1,5 или 2,0 мл.
- 6.1.5. Физиологический раствор.
- 6.1.6. Стерильные гинекологические инструменты.
- 6.1.7. Стерильные пластиковые контейнеры.
- 6.1.8. Стерильные шприцы и резиновые трубки.
- 6.1.9. Шпатель, пинцет.
- 6.1.10. Скальпель, ножницы.

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

- 6.2.1. Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл или 2 мл.
- 6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки для центрифугирования типа «Falcon» объемом 5 или 15, или 50 мл.
- 6.2.3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.
- 6.2.4. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» не менее 2 000 g.
- 6.2.5. Фарфоровые ступки и песты или гомогенизатор.
- 6.2.6. Ножницы.
- 6.2.7. Анатомический пинцет.
- 6.2.8. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор.
- 6.2.9. Мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм.
- 6.2.10. Ватно-марлевые фильтры.
- 6.2.11. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 10 до 1000 мкл.
- 6.2.12. Автоматические дозаторы переменного объема.
- 6.2.13. Стеклянная или полипропиленовая воронка.
- 6.2.14. Центрифуга-вортекс.
- 6.2.15. Аналитические или прецизионные весы.

6.3. Экстракция НК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм ВЕТ» («Формат 96») производства ООО «НекстБио», Россия или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой набор, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала от животных и птиц (кровь, мазки со слизистых оболочек влажной полости, носовой полости, ротоглотки, конъюнктивы, смывы с препуция, ректальные мазки, мазки из клоаки (у птиц), фекалии, тканевой (аутопсийный) материал (печень, селезенка, легкие и др.)) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- состав набора включает реагенты ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В (внутренний контрольный образец);
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции НК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм ВЕТ» («Формат Контроли»). Реагент ВКО В следует добавлять во все исследуемые образцы, а также в отрицательный контрольный образец (ОКО).

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов:

- плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM и R6G с характеристиками, указанными в таблице 4;

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4$ °C;
- скорость нагрева не менее 2 °C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/сек.

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °C.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- образцы цельной крови;
- мазки со слизистых оболочек влагаллица, носовой полости, ротоглотки, конъюнктивы, ректальные мазки, мазки из клоаки (у птиц);
- смывы с препуция;
- фекалии;
- тканевой (аутопсийный) материал (печень, селезенка, легкие и др.).

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Цельную кровь отбирают после длительного голодания (не менее 6 часов) в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА). Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Мазки со слизистых оболочек носовой полости, ротоглотки, ректальные мазки, мазки из клоаки (у птиц) получают с помощью стерильных зондов с ватными тампонами. После забора материала рабочую часть зонда с ватным тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора. Конец зонда отламывают для того, чтобы крышка пробирки плотно закрылась. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Мазки с конъюнктивы берут стерильными зондами с ватными тампонами. Тампон смачивают в физиологическом растворе и, оттянув веко животного, проводят зондом по слизистой по направлению к носу, омывая глазное яблоко. Аналогично берут мазок со второго глаза. 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.

Мазки со слизистой оболочки влагалища берут из заднебокового свода влагалища с использованием стерильных гинекологических инструментов с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой или физиологического раствора. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Фекалии (помет) отбирают шпателем по 1-5 г в стерильный пластиковый контейнер.

Тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты тканей и органов) отбирают хирургическими инструментами и помещают пробы в стерильный пластиковый контейнер.

Смывы с препуция берут в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторному исследованию спермы производителей, а также препаратов и инструментов, применяемых при искусственном осеменении животных, на бактериальную загрязненность» (пункт 3 документа).

7.2. Подготовка материала к исследованию

Цельная кровь, мазки со слизистых оболочек влагалища, носовой полости, ротоглотки, конъюнктивы, смывы с препуция, мазки из клоаки (у птиц) не требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий (помет) массой 0,1 г (0,1 мл) внести отдельным наконечником с фильтром (или одноразовой лопаткой) в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного физиологического раствора) и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии. Суспензии фекалий и ректальные мазки центрифугируют при 1,5 тыс об/мин в течение 2 мин. Экстракцию ДНК проводят из 100 мкл надосадочной жидкости.

Тканевой (аутопсийный) материал объемом 0,2-0,3 см³ (200-300 мкл) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят ~ 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Полученную суспензию центрифугируют при 1,5 тыс об/мин в течение 2 мин. Экстракцию ДНК проводят из 100 мкл надосадочной жидкости.

7.3. Условия хранения материала для исследования

Образцы исследуемого материала (за исключением цельной крови) хранят при следующих условиях:

- при температуре 2 – 8 °С – в течение 1 суток (цельную кровь допускается хранить при данной температуре в течение 7 суток);
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается хранение гомогенатов при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 месяца.

Допускается однократное замораживание всех образцов.

Несоблюдение условий хранения может привести к получению некорректных результатов исследования.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75%.

8.1. Экстракция НК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)⁴ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В)⁴.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца⁵ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ВКО В⁴ – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОК;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции НК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ»), или **100 мкл** (при использовании набора «МагноПрайм ВЕТ», или **50 – 100 мкл** (при использовании другого набора для экстракции согласно инструкции к нему).

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее применению.

8.2.1. Рассчитать объемы для **ПЦР-смеси ChI-spp** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь ChI-spp	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	5,0*(N+1)	

³ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁴ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁵ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.2.2.Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью ChI-spp** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3.Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4.Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5.Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1.Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**.

8.3.2.Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **ПКО ChI-spp**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОКО)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

в) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **К-**.

8.3.3.Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G ⁶	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

⁶ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание: рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager версии 2.0 или выше (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых (см. п. 8.5.) зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2 каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁷
Продукт амплификации	ДНК <i>Chlamydia</i> spp.	ВКО В

8.5. Используемые настройки амплификаторов

Рекомендуемые настройки для приборов указаны в таблицах 8 - 10.

Таблица 8

Рекомендуемые настройки для приборов роторного типа

Канал	Опт.уровня сигнала	Порог	Устранение выбросов	Динамический фон	Корректировка уклона	Исключить циклы
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	0,03	5-15 %	включен	включена	от 1 до 5
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	0,05	5-15 %	включен	включена	от 1 до 5

При запуске прибора роторного типа в окне «Автооптимизация уровня сигнала» активировать функцию «Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции».

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки согласно таблице 9.

⁷ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Настройки для прибора «CFX96»

Параметр	Шаг этапа циклирования	Скорость нагревания/охлаждения
Step Options	95 °C	2,5 °C/сек
	60 °C	2,5 °C/сек

Анализ результатов для прибора «CFX96»:

Провести анализ результатов по каналам **FAM**, **R6G** (для каждого канала по отдельности), активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.

Для настройки базовой линии выберите меню **Settings** (Настройки), затем последовательно нажмите кнопки **Base Line Subtracted Curve Fit** (Подбор кривой по точкам с вычетом базовой линии) и **Apply Fluorescence Drift Correction** (Применить коррекцию смещения флуоресценции). В меню **Threshold Cycle Calculation** (Пороговый уровень базовой линии) выбрать режим ручной установки пороговой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** (Циклы базовой линии) выбрать **Auto Calculated** (Рассчитан автоматически), а в подменю **Single Threshold** (Единый пороговый уровень) выбрать **User Defined** (Определен пользователем) и применить настройки, указанные в таблице 10.

Таблица 10

Рекомендуемые настройки для приборов планшетного типа

Канал	Threshold / Порог	Исключить циклы
FAM	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 - 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для ПКО ChI-spp в последнем цикле амплификации.	от 1 до 5
R6G	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ОКО в последнем цикле амплификации.	от 1 до 5

8.6. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 12. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager версии 2.0 или выше (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 11 - 12.

Таблица 11

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ПКО ChI-spp (положительный контроль)	Определено Ct ≤ 33,0 / ≤ 34,0	Отсутствует
ОКО (отрицательный контрольный образец)	Отсутствует	Определено Ct ≤ 34,0 / ≤ 37,0
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует, при этом значение Ct по каналу R6G определено $\leq 34 / \leq 37$	ДНК микроорганизмов семейства <i>Chlamydiaeae</i> не обнаружена
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и R6G определено. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции	ДНК микроорганизмов семейства <i>Chlamydiaeae</i> обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует, при этом значение Ct по каналу R6G определено $> 34 / > 37$ или отсутствует	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.7.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM и R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

8.7.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.7.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM и R6G, что свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® *Chlamydia* spp.» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл. Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК вирусов и микроорганизмов (см. таблицу 13). ДНК вирусов и микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемых с помощью набора микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae*.

Таблица 13

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизм/вирус	
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>Brucella canis</i>	<i>Brucella ovis</i>
<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella neotomae</i>
<i>Brucella suis</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	<i>Chlamydia abortus</i>
<i>Chlamydia felis</i>	<i>Chlamydia muridarum</i>
<i>Chlamydia pecorum</i>	<i>Chlamydia pneumonia</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Chlamydia suis</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia caviae</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Clostridium perfringens</i> mun A
<i>Clostridium perfringens</i> mun B	<i>Clostridium perfringens</i> mun C
<i>Clostridium perfringens</i> mun D	<i>Clostridium perfringens</i> mun E
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
<i>Haemophilus parasuis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i>
<i>Leptospira interrogans</i> Pomona	<i>Morganella morganii</i>
<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i>
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>

Микроорганизм/вирус	
<i>Mycoplasma mycoides</i>	<i>Mycoplasma pneumonia</i>
<i>Mycoplasma salivarium</i>	<i>Mycoplasma synovia</i>
<i>Neospora caninum</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus gr B</i>
<i>Streptococcus gr G</i>	<i>Streptococcus gr A</i>
<i>Streptococcus milleri</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Avian paramyxovirus 1</i>	<i>Avian paramyxovirus 2</i>
<i>Avian infectious bronchitis virus (IBV)</i>	<i>Bovine herpesvirus 1</i>
<i>Bovine herpesvirus 4</i>	<i>Bovine leukemia virus</i>
<i>Bovine viral diarrhea virus</i>	<i>Bovine parainfluenza-3 virus</i>
<i>Bovine respiratory syncytial virus</i>	<i>Bovine coronavirus</i>
<i>Influenza A</i>	<i>Influenza B</i>
<i>Influenza C</i>	<i>Gallid alphaherpesvirus 1 (GaHV-1)</i>
<i>Sheeppox virus</i>	<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i>
<i>Porcine parvovirus</i>	<i>Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus</i>
<i>Porcine circovirus</i>	<i>Transmissible gastroenteritis coronavirus</i>
<i>Rotavirus A</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>
<i>Canine distemper virus</i>	<i>Canine adenovirus type 2</i>
<i>Felid alphaherpesvirus 1</i>	-

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных вирусов и микроорганизмов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

Показано отсутствие значений порогового цикла Ct по каналам для флуорофоров FAM и R6G в отношении образцов ДНК человека, свиньи, КРС, МРС, собаки, кошки, курицы, голубя, индейки.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование не более 3 суток при температуре от 8 до 25 °С.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси *Chl-spp* и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® *Chlamydia spp.*» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

REF

Номер по каталогу



Изготовитель

LOT

Код партии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению