

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека (ФБУН
ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора)



В.Г. Акимкин

« 26 » _____ 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «*Chlamydia* spp.» для
выявления ДНК *Chlamydia* spp.
методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «*Chlamydia* spp.» предназначена для выявления ДНК микроорганизмов рода *Chlamydia* в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК *Chlamydia* spp. основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с ДНК **экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-FL)**, амплификации полученной ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». ВКО-FL 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 амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Результат амплификации ДНК *Chlamydia* spp., а также ДНК ВКО-FL регистрируется по двум различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

| Канал для флуорофора | FAM | JOE |
|----------------------|------------|---------------------------|
| ДНК-мишень | ДНК ВКО-FL | ДНК <i>Chlamydia</i> spp. |

Тест-система содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. 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 дезоксиуридинтрифосфат 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 полностью и необратимо инактивируется при нагревании выше 50 °С.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, limit of detection, LOD)

Таблица 2

| Вид исследуемого материала | Объем образца для экстракции, мкл | Комплект для экстракции ДНК/РНК | Комплект для амплификации | Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| фекалии, ректальные мазки, тканевой (аутопсийный) материал (суспензия), мазки со слизистых оболочек, смывы с препуция | 100 | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F | 1x10 ³ |

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Порядок отбора и подготовки проб».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность тест-системы доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов: *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, *Brucella neotomae*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*, *Campylobacter fetus* ssp. *fetus*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens* тип А, *Clostridium perfringens* тип В, *Clostridium perfringens* тип С, *Clostridium perfringens* тип D, *Clostridium perfringens* тип Е, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Leptospira interrogans* Pomona, *Morganella morganii*, *Mycobacterium avium* ssp. *avium*, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium intracellularis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma genitalium*,

Mycoplasma gallisepticum, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma pneumonia*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma synovia*, *Neospora caninum*, *Pantoea agglomerans*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus* gr B, *Streptococcus* gr G, *Streptococcus* gr A, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 4*, *Bovine leukemia virus*, *Bovine viral diarrhea virus*, *Bovine parainfluenza-3 virus*, *Bovine respiratory syncytial virus*, *Bovine coronavirus*, *Sheeppox virus*, *Porcine epidemic diarrhea virus*, *Porcine parvovirus*, *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus*, *Porcine circovirus*, *Transmissible gastroenteritis coronavirus*, *Porcine teschovirus*, *Rotavirus A*, *Suid herpesvirus 1*, *Canine distemper virus*, *Canine adenovirus type 2*, *Felid alphaherpesvirus 1*, а также геномной ДНК разных видов животных.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных организмов и ДНК животных неспецифических реакций выявлено не было.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Chlamydia* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации ДНК *Chlamydia* spp. с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

| Реагент | Объем, мл | Количество |
|------------------------------------|-----------|------------|
| ПЦР-смесь-FL <i>Chlamydia</i> spp. | 0,6 | 1 пробирка |
| ПЦР-буфер-С | 0,3 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | 0,03 | 1 пробирка |
| К+ <i>Chlamydia</i> spp. | 0,2 | 1 пробирка |
| К– | 0,2 | 1 пробирка |
| ВКО-FL | 0,5 | 1 пробирка |
| ОКО | 1,2 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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 фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, 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 сушильном 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.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему 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.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. 0,9% раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания, или аналогичный).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», или аналогичный).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

5. 0,9% раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
6. Глицерин для проведения пробоподготовки фекалий.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

8. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
12. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

16. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп».
17. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к соответствующему комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

18. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» FRT-50 F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 20. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 22. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 23. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 24. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)) и другие, рекомендованные Изготовителем).
 25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 26. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 27. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: фекалии, ректальные мазки, тканевой (аутопсийный) материал (печень, селезенка, легкие и др.), мазки со слизистых оболочек, смывы с препуция.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Мазки со слизистых оболочек носовой полости, ротоглотки, ректальные мазки 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 стерильным зондом с использованием стерильных гинекологических инструментов. Собранный материал помещают в пробирку, содержащую 500 мкл стерильного физиологического раствора.

Фекалии (1-5 г) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты тканей и органов) помещают 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».

Материал доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;

- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.
Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

Мазки со слизистых оболочек влагалища, носовой полости, ротоглотки, конъюнктивы, смывы с препуция не требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий и тканевой (аутопсийный) материал требуют предварительной подготовки.

Тканевой материал объемом 0,2-0,3 см³ (200-300 мкл) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят ~ 10% (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин и 100 мкл верхней фазы суспензии используют для экстракции РНК/ДНК. Допускается хранение гомогенатов при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 месяца.

Из фекалий готовят ~10 % (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензии фекалий и ректальные мазки центрифугируют при 1,5 тыс об/мин в течение 2 мин. Экстракцию ДНК проводят из 100 мкл надосадочной жидкости.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемого материала.

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используется комплект реагентов «РИБО-преп».

Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контроля проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

Аmplификация и детекция продуктов амплификации.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР.

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Chlamydia spp.*, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-FL *Chlamydia spp.*, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-FL *Chlamydia spp.*;**
- **5 мкл ПЦР-буфера-С;**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл реагента К–.**
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл К+ *Chlamydia spp.***
- в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – внести в пробирку 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.**

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью прибора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) смотрите в Приложении 2.

Интерпретация результатов.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Таблица 3

| Канал для флуорофора | FAM | JOE |
|--|--------|---------------------------|
| Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации | ВКО-FL | ДНК <i>Chlamydia</i> spp. |

Результаты интерпретируются 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). Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 4

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

| Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора | | Результат |
|---|----------------------|---|
| FAM | JOE | |
| ≤ 33 | отсутствует | ДНК <i>Chlamydia</i> spp. НЕ обнаружена |
| определено или отсутствует | ≤ 35 | ДНК <i>Chlamydia</i> spp. обнаружена |
| отсутствует или > 33 | отсутствует или > 35 | Невалидный* |
| ≤ 33 | > 35 | Сомнительный** |

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена ДНК *Chlamydia* spp. При получении отрицательного результата в повторной постановке считать, что в образце не обнаружена ДНК *Chlamydia* spp.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и

отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции (см. табл. 5).

Таблица 5

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора | |
|----------|--------------------------------------|--|-------------|
| | | FAM | JOE |
| OK | Экстракция ДНК | ≤ 33 | отсутствует |
| K- | ПЦР | отсутствует | отсутствует |
| K+ | ПЦР | ≤ 30 | ≤ 30 |

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM, JOE отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 5. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM, JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

При получении разуконтировать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL *Chlamydia* spp., ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL *Chlamydia* spp., ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Chlamydia* spp. хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «*Chlamydia* spp.» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru².

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

А. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.

- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 6

Программа амплификации

| Цикл | Температура, °C | Время | Измерение флуоресценции | Количество циклов |
|------------------------------|-----------------|--------|--------------------------|-------------------|
| Hold 1/ Удерж. темп-ры 1 | 95 | 15 мин | - | 1 |
| Cycling 1/ Циклирование 1 | 95 | 10 с | - | 5 |
| | 60 | 20 с | - | |
| | 72 | 10 с | - | |
| Cycling 2/ Циклирование 2 | 95 | 10 с | - | 40 |
| | 55 | 20 с | FAM/Green, JOE/Yellow | |
| | 72 | 10 с | - | |

- Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-мых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции**. Для каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все

исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов по каналу FAM/Green:

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналу JOE/Yellow провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 7

| Канал | Threshold/ Порог | Dynamic tube/ Динамич.фон | Slope Correct/ Коррек. уклона | More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов |
|------------|---------------------|------------------------------|----------------------------------|---|
| FAM/Green | 0,05 | включена | включена | 10% |
| JOE/Yellow | 0,1 | включена | включена | 10% |

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Проведение ПЦР и детекция флуоресцентного сигнала

- Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
- В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
- В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Таблица 8

| Цикл | Температура, °C | Время | Измерение флуоресценции | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------|-------------------|
| 1 | 95 | 15 мин | - | 1 |
| 2 | 95 | 10 с | - | 5 |
| | 60 | 25 с | - | |
| | 72 | 25 с | - | |
| 3 | 95 | 10 с | - | 40 |
| | 55 | 25 с | FAM, HEX | |
| | 72 | 25 с | - | |

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.

```

1  95.0 C for 15:00
2  95.0 C for 0:10
   Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
3  60.0 C for 0:25
   Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
4  72.0 C for 0:25
   Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
5  GOTO 2, 4 more times
6  95.0 C for 0:10
   Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
7  55.0 C for 0:25
   + Plate Read
   Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
8  72.0 C for 0:25
   Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
9  GOTO 6, 39 more times
    
```

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать

Сохранить.

- Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM**, **HEX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

- Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Анализ результатов

- Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
- В окне Data Analysis во вкладке Quantification представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
- Для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне 5-10 %

от максимального значения флуоресцентного сигнала образца К+. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем, и не пересекать базовую линию.

Примечание – Чтобы выделить график образца «К+» (или другого желаемого образца), установить курсор в схеме планшета либо в таблице результатов.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Дата изменения



Температурный диапазон



Изготовитель



Не допускать воздействия солнечного света



Дата изготовления



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению