

**ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИЙ РОДА CHLAMYDIA  
МЕТОДОМ ПЦР-РВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO  
«ROSSAvet CHLAMYDIA»**

**Назначение и характеристика**

Набор реагентов «ROSSAvet CHLAMYDIA» предназначен для выявления ДНК бактерий рода Chlamydia (*C. abortus*, *C. psittaci*, *C. suis*, *C. felis*, *C. pecorum*) в биологическом материале: соскобы слизистых оболочек (конъюнктивы, ротоглотки, носоглотки, урогенитального тракта, а у птиц – клоаки), кусочки плодовых оболочек, тканевой (аутопсийный) материал (печень, селезенка, легкие и др.), эякулята, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Комплектация набора «ROSSAvet CHLAMYDIA» выпускается в двух форматах упаковки: Формат №1 на 50 реакций, Формат №2 на 100 реакций, не включая контроли.

**Таблица 1. Состав набора реагентов**

Состав	Комплектация Ф№1	Комплектация Ф№2
1. Праймер микс	1 пробирка - 0,4 мл	1 пробирка - 0,8 мл
2. ПЦР-реагент	1 пробирка - 0,65 мл	1 пробирка - 1,3 мл
3. ПКО	1 пробирка - 0,2 мл	1 пробирка - 0,2 мл
4. ОК0	1 пробирка - 1,0 мл	1 пробирка - 1,0 мл
5. ВКО	1 пробирка - 0,5 мл	1 пробирка - 1,0 мл

**Меры предосторожности**

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Подготовку и проведение исследования с использованием набора реагентов следует выполнять в ПЦР-боксах.

Дозаторы, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом проверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

При использовании набора в диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортировки и хранения;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечении срока годности набора.

**Оборудование и материалы**

- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
- ламинарный бокс/ПЦР-бокс;
- центрифуга/вортекс типа MICROSPIN FV-2400 ;
- набор дозаторов переменного объема (до 10 мкл, до 200 мкл, до 1000 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема (10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл);
- пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл;
- оптические пробирки или стрипы для ПЦР 0,2 мл;
- соответствующие штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С.
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

**Проведение анализа**

**Выделение ДНК.**

! Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка биоматериала, которая производится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя к набору реагентов для выделения. Во избежание получения не корректных результатов необходимо следовать «Рекомендациям по забору и транспортировке биоматериала» производства компании ООО «ROSSA».

**! Добавить 10 мкл ВКО в каждую пробирку на этапе выделения в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения.**

Выделение производится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения ДНК. Рекомендуемый набор для выделения ДНК из биологического материала- SilicSorbNA.

**Подготовка ПЦР-смеси**

1. Разморозить все реагенты, перемешать и осадить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

2. Приготовить и промаркировать необходимое количество пробирок по 0,2 мл. В каждую постановку амплификации, помимо исследуемых образцов, должны входить контрольные образцы: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

3. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «**Мастер Микс**» по формуле:

**12,5 ×(N+1) мкл ПЦР-реагента и 7,5 ×(N+1) мкл Праймер микс;**

где **N** - общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер микс» на вортексе и осадить капли со стенок и крышек пробирок с помощью кратковременного центрифугирования.

4. Внести по **20 мкл Мастер-микса** в подготовленные пробирки для проведения ПЦР.

5. Добавить по **5 мкл ДНК** исследуемых образцов, в пробирку К- внести **5 мкл ОК0**, в пробирку К+ **5 мкл ПК0**, в пробирку ОКЭ внести **5 мкл ОКЭ**.

6. Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок - удалить кратковременным центрифугированием.

**Постановка реакции амплификации**

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

**Таблица 2. Параметры амплификации**

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг/Элонгация	60	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	35
Отжиг/Элонгация/Детекция по каналам FAM, ROX	60	15 сек	

3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать расположение пробирок в амплификаторе, запустить амплификацию и сохранить файл с результатами эксперимента.

**Анализ результатов**

! Результат амплификации **внутреннего контрольного образца** регистрируется по каналу **FAM**, результат амплификации **ДНК возбудителя** регистрируется по каналу флуоресценции **ROX**.

1. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору, установить «Пороговый Метод (Ct)», при необходимости установить значение параметра пороговой линии, выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке - переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

2. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

**Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек**

Контрольная точка	Значение «Ct» по каналу «FAM» (Внутренний контрольный образец)	Значение «Ct» по каналу «ROX» (ДНК возбудителя)
ОКЭ*	+	-
К-**	-	-
К+	+	+

\*В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

\*\*В случае несоответствия контрольных точек К- необходимо провести повторное исследование всех образцов, начиная с этапа амплификации.

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

**Таблица 4. Интерпретация результатов анализа**

Результат образца	Значение «Ct» по каналу «FAM» (Внутренний контрольный образец)	Значение «Ct» по каналу «ROX» (ДНК возбудителя)
Положительный	+/-	+
Отрицательный	+	-
Не валидный*	-	-

«-» - значения «Ct» отсутствует, график амплификации не пересекает пороговую линию;

«+» - наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию;

«+/-» - значение «Ct» для данного канала не анализируется.

\*В случае не валидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа взятия биологического материала.

**Проблемы при работе и методы их устранения.**

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
Нет сигнала по всем каналам	Использование неподходящих расходных материалов	Используйте оптические пробирки для постановки ПЦР с прозрачными крышками, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора, либо адаптированные для используемого прибора
	ПЦР ингибирование	Разведите образец в 5 раз в воде, повторите анализ
		Повторите ПЦР-анализ, начиная с этапа экстракции
Нет сигнала в К+	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	Аккуратно приготовьте новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	Установите параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	Используйте наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала по каналу «ROX» в К- и/или ОКЭ	Контаминация	Проведите деконтаминационные процедуры

**Транспортировка**

Транспортировка наборов реагентов осуществляется при температуре от минус 24°С до минус 16°С. Допускается транспортировка любым видом транспорта при температуре от 4°С до 8°С, не более 48 часов, в условиях, обеспечивающих сохранность набора, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

**Хранение**

Компоненты набора реагентов хранят в упаковке изготовителя при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Допускается заморозка/оттаивание компонентов не более 10 раз. Срок годности набора реагентов - 12 месяцев с даты изготовления, при соблюдении условий хранения набора реагентов.

**Производитель**

ООО «ROSSA», Узбекистан, г. Нурафшан, посёлок Дегантепа, улица Рохат дом 93 Tel.: +99870 202 60 60 •E-mail: [info@rossa.uz](mailto:info@rossa.uz)

**Служба поддержки клиентов:** +99899 353 37 87