



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-ОРНИТОЗ-ФАКТОР» для
выявления ДНК возбудителя орнитоза (*Chlamydophila psittaci*) в
биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле**

21.10.60-343-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение	4
2. Характеристика набора реагентов	4
3. Аналитические и диагностические характеристики	6
4. Меры предосторожности.....	6
5. Материалы и оборудование	7
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	8
7. Проведение анализа	9
8. Интерпретация результатов анализа	12
9. Условия транспортирования	13
10. Условия хранения	13
11. Срок годности	13
Приложение 1. Приготовление реакционной смеси	13
Приложение 2. Лист вносимых изменений	14

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор реагентов «ПЦР-Ф-ОРНИТОЗ-ФАКТОР» (далее набор реагентов) предназначен для выявления ДНК *Chlamydomonada psittaci* в биологическом материале (мазки со слизистой ротоглотки и миндалин; фрагменты тканей и органов; помет птиц) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей детекцией продуктов амплификации электрофорезом в агарозном геле.

2. Характеристика набора реагентов

2.1 Принцип действия

Метод обнаружения ДНК *Chlamydomonada psittaci* основан на экстракции ДНК из биологического материала совместно с ДНК экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО) с последующим исследованием методом мультиплексной ПЦР (полимеразная цепная реакция). Анализ результатов ПЦР-амплификации осуществляется методом электрофореза в агарозном геле.

2.2 Состав набора реагентов

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) для анализа 55 клинических образцов (включая контрольные образцы)
- 2) для анализа 110 клинических образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Состав комплекта №1

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР CPSF	жидкость темно-зеленого цвета	830	1660	1
2	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	17	33	1
3	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	Прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1
4	Минеральное масло МИН. МАСЛО	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2000	2000	1(2)

Таблица 2. Состав комплекта №2

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО Т1 ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер) ²	Прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО CPSF	Прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

¹ Возможна легкая опалесценция

² Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

В набор реагентов не входят реактивы для выделения ДНК. Выделение ДНК может проводиться, например, с помощью наборов выделения на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, наборов выделения на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный

В набор реагентов не входят реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК других микроорганизмов: *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma sinovia*; *Brucella suis*; *Brucella abortus*; *Brucella ovis*; *Brucella canis*; *Pasterella multocida*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium avium*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter fetus*; *Clostridium perfringens*; *Salmonella dublin*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus suis*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, вируса инфекционного бронхита кур, вируса болезни Ньюкасла, вируса гриппа А.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК курицы, голубя, человека, свиньи, КРС, собаки, кошки.

4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследование проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

5.1. Для зоны выделения ДНК из клинического материала:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, фирмы «Ахуген», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК (см. пункт 2.2).

5.2. Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Терцик», ДНК-технология).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема на 2-20, 20-200 и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 и 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).

- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 мл (например, «Хеликон», Россия).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,5 и 1,5 мл (например, «Ахугене», США);
- Штативы для микропробирок на 0,5 и 1,5-2,0 мл (например, «Хеликон», Россия);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

5.3 Для зоны электрофоретического анализа

- Камера для горизонтального электрофореза (например: «SE2», «Хеликон»);
- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например: Эльф-4, «ДНК-технология»);
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например: «Vilber Lourmat»);
- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например: «Vilber Lourmat»), «Биотест-1»);
- Микроволновая печь для плавления агарозы;
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для приготовления агарозы;
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза;
- Штатив для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-50 мкл;
- Одноразовые наконечники до 200 мкл;
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромистый этидий;
- Отдельный халат и одноразовые перчатки;

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования

Для исследования используют следующий материал от птиц:

- Мазки со слизистой ротоглотки и миндалин снимают с помощью стерильного зонда, зонд помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора;
- Фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.) отбирают в стерильный контейнер.
- Помет птиц отбирают в стерильные контейнеры в количестве 1–3 г.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре от 2 до 8°C – в течение суток;
- при температуре не выше минус 20°C – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68°C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2. Подготовка исследуемого материала

Мазки со слизистых конъюнктивы и ротоглотки исследуют без предварительной подготовки.

Из помета птиц готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Взвесь декантируют в течении 5-10 минут. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в чистую пробирку 1,5 мл, центрифугируют при 5000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, в течение 5 мин. 100 мкл надосадочной жидкости используют в выделение.

Исследуемые пробы тканей и органов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем обычно готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2000 об./мин в течение 5-10 минут. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК. В некоторых случаях образовавшуюся суспензию не центрифугируют, а отстаивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой (или наконечником с аэрозольным барьером) в пробирки на 1,5 мл, и в количестве 0,1 мл используют для выделения НК.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Анализ с помощью набора реагентов «ПЦР-Ф-ОРНИТОЗ-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК³;
- проведение ПЦР;
- анализ продуктов амплификации методом электрофореза⁴;
- учет результатов анализа.

7.1. Экстракция (выделение) НК из клинического материала

³ см. пункт 2.2

⁴ для электрофоретического анализа необходим дополнительный комплект реактивов. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО Т1**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции, к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО⁵ (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять НК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК.

7.2. Подготовка к проведению ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО CPSF, ВКО Т1 и ОКО**.

В отдельной пробирке смешать следующие компоненты набора реагентов из расчета на каждую реакцию (расчеты объемов **ПЦР CPSF** и полимеразы на различное количество реакционных пробирок приведены в приложении 1):

- 15 мкл **ПЦР СМЕСЬ CPSF**;
- 0,3 мкл **TAQ POLYMERASE**

Перемешать смесь на вортексе (без вспенивания), после чего сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых ДНК и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

В случае использования амплификаторов без подогревающейся крышки («Терцик», «ДНК технология») сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ДНК буфера;
- б) в пробирки для исследования по 10 мкл НК из исследуемых образцов (включая ВК-, см. п.7.1);
- в) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл **ПКО CPSF**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор встряхнуть пробирки, после чего осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на

⁵ Вместо **ОКО** допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

вортексе (1-2 секунды). Установить пробирки в амплификатор. Режим термоциклирования приведен в Таблицах 3, 4.

Таблица 3. Температурно-временной режим амплификации (Терцик, 0,5 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим (точный)	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 30 сек	40
	60°C – 30 сек	
	72°C – 40 сек	
3	72°C – 2 мин	1

Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации (ДТ, 0,2 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 15 сек	40
	60°C – 15 сек	
	72°C – 20 сек	
3	72°C – 1 мин	1

После окончания реакции переставить пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре. Для длительного хранения требуется заморозка.

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.

7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Внимание: Работа с амплифицированными продуктами должна производиться в отдельной комнате сотрудником, не производящим манипуляций в чистых помещениях.

Поставить электрофорез исследуемых и контрольных проб согласно инструкции производителя набора для детекции амплифицированной ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

8. Интерпретация результатов анализа

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной НК (см. табл. 5).

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения нуклеиновых кислот.

Таблица 5. Оценка результатов анализа.

Проба	Полоса электрофореграмме		Результат
	350 п.н.	500 п.н.	
	CPSF	BKO	
ПКО К+	есть	есть	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер К-	нет	нет	Реакция прошла успешно
	есть	нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	нет	есть	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	нет	есть	Экстракция прошла успешно
	есть	есть или нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	нет	нет	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	есть	есть или нет	Результат анализа положительный. <i>ДНК Chlamydophila psittaci обнаружена</i>
	нет	есть	Результат анализа отрицательный
	нет	нет	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- отсутствует полоса ВКО, а в К+ и исследуемых образцах полоса ВКО присутствует – результаты можно считать достоверными. Также в случае полоса ВКО в К+ отсутствует, а в ВК- и образцах присутствует – результаты можно считать достоверными.

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения St для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то

есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения Ct на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации.

9. Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «ПЦР-Ф-ОРНИТОЗ-ФАКТОР» должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2°C до 8 °C, не более 5 суток.

10. Условия хранения

Хранение комплектов набора «ПЦР-Ф-ОРНИТОЗ-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°C.

11. Срок годности

Срок годности набора реагентов «ПЦР-Ф-ОРНИТОЗ-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Приготовление реакционной смеси

Количество реакций	Объем ПЦР CPSF, мкл	объем TAQ POLYMERASE, мкл
3	45	0,9
4	60	1,2
5	75	1,5
6	90	1,8
7	105	2,1
8	120	2,4
9	135	2,7
10	150	3
15	225	4,5
20	300	6
25	375	7,5
30	450	9
35	525	10,5
40	600	12
45	675	13,5
50	750	15
55	825	16,5

Приложение 2. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 18.11.2020	Пункт 7. Проведение анализа	Изменен температурно-временной режим амплификации
Версия 1.2 от 26.05.2021	стр. 5, стр. 10	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.3 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.4 от 24.02.2022	п. 6.2. Подготовка исследуемого материала	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке
Версия 1.5 от 04.05.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-Ф-ОРНИТОЗ-ФАКТОР» или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru