



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК возбудителя
криптоспориидиоза собак - *Cryptosporidium canis* в
клиническом материале методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в
режиме «реального времени»
«Зайцев+® *CryptoCan*»

C-05

Набор реагентов состоит из двух комплектов:

- «Зайцев+® EXT» - для выделения РНК/ДНК из клинического материала;
- «ПЦР-СуртоСан» - для ПЦР-амплификации ДНК возбудителя криптоспоридиа собак - *Cryptosporidium canis* с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Комплект реагентов «Зайцев+® EXT» включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	9	4 флакона
Раствор для пренипитации	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Буфер для элюции НК	Прозрачная бесцветная жидкость	2	5 пробирок

Комплект реагентов «ПЦР-СуртоСан» включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-СуртоСан	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка

К комплекту реагентов прилагаются следующие контрольные образцы:

Отрицательный контроль выделения НК	Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета	0,5	1 пробирка
Внутренний контроль «СуртоСан-ВК»	Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета	0,5	1 пробирка
Положительный контроль ПЦР «СуртоСан+»	Прозрачная бесцветная жидкость	0,05	1 пробирка
Отрицательный контроль ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	0,05	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контрольные образцы.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов «Зайцев+® *CryptoСan*», предназначенный для выявления ДНК возбудителя криптоспоридиа собак - *Cryptosporidium canis* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Принцип тестирования: выделение ДНК возбудителя криптоспоридиа собак - *Cryptosporidium canis* из клинического материала совместно с внутренним контрольным образцом; проведение реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме «реального времени».

Набор реагентов рассчитан на 100 тестов, включая контрольные образцы.

ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ.

Для проведения анализа возможно использование следующего клинического материала: ректальные мазки, кал. При исследовании кала материал предварительно необходимо развести в физиорастворе. Кал весом 0,01 -0,02 г (примерный размер рисового зерна) вносится в пробирку, содержащую 1 мл физиораствора и тщательно перемешивается на вортексе. Затем пробирка открывается на центрифуге при 3000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают для анализа. Клинический материал пригоден для исследования в течение трех суток при хранении от 2-4°C.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Работают только в одноразовых перчатках, используют и меняют при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.
2. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2%-ный раствор ДП-2Т.
3. Анализ рекомендуется проводить в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК из клинического материала требуются.

1. Стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВн-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы» Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100°C (например, «ТЕРМО 24-15», «Бюльок», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 15 тыс. об/мин. (например, «Elmi», Латвия; «Hettich», Германия, «Sartorius», Германия).
4. Воротекс (например «ЭТА-2», «Бюльок», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель мелнишней с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «Армед», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Леншипет», Россия).
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Одноразовые, плотно закрывающиеся, полипропиленовые микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Артас», Италия).
9. Шпатели для микропробирок на 1,5 мл (например, «Хеликон», Россия) и наконечников (например, «Артас» Италия).
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (например, «Артас» Италия).
11. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером (например, «Артас» Италия).
12. Холодильник от 2 до 8 °С.
13. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения полимеразной цепной реакции требуются.

1. Амплификатор с детектирующей системой в режиме реального времени (например, CFX-96, BioRad, США; QuantStudio 3, Thermo FS, США, ДТ-96, ДНК-технология, Россия; Rotar-Gene Q 5plex, QIAGEN, Германия).
2. ПЦР-боксы (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вortex (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленинет», Россия).
5. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (например, Thermo FS, США).
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Tarson», Индия).
7. Шпатель для наконечников (например, «Tarson», Индия) и микропробирок на 0,2 мл (например, «Хеликон», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.**

Проводится в ЗОНЕ 1 - комнате для обработки клинического материала.

Порядок работы.

1. Если в лизирующем растворе образовались кристаллы, то его необходимо прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка. Для выделения ДНК из 24 проб (1 панель), включая контроль, в емкость с лизирующим раствором стерильным наконечником с барьером добавить 100 мкл **внутреннего контроля «СупроCan-ВК»**. Емкость тщательно перемешать. Если лизирующий раствор не был израсходован полностью, то его можно поместить в холодильник на 2 до 8 °С, затем использовать повторно (хранить не более трех суток).
2. В пробирку на 1,5 мл раскapat на 300 мкл приготовленного лизирующего раствора.
3. В каждую пробирку добавить по 100 мкл **клинического образца**, закрыть крышку и перемешать на vortexe.
4. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль выделения ДНК. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить 100 мкл **отрицательного контроля «ОК»**. Образец перемешать на vortexe.
5. Все пробирки перемешать на vortexe и поместить в термостат на 5 мин при температуре 65°С.
6. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки при 10 тыс. об/мин в течение 1 мин.
7. В каждую пробирку добавить 400 мкл **раствора для преципитации**. Пробирки тщательно перемешать на vortexe и инкубировать при комнатной температуре 5 мин.
8. Центрифугировать пробирки при 15 тыс. об/мин в течение 5 мин.
9. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель. Отбирать жидкость с осторожностью, не задывая осадка.
10. Добавить в пробирку по 400 мкл **раствора для отмывки 1**. Перемешать на vortexe и центрифугировать пробирки при 15 тыс. об/мин в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
11. Добавить в пробирку по 400 мкл **раствора для отмывки 2**. Перемешать на vortexe и центрифугировать пробирки при 15 тыс. об/мин в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Высушить осадок, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при 65 °С на 10 минут.
13. Растворить осадок в 50 мкл **Буфера для элюции НК**. Закрыть крышки пробирок, тщательно перемешать и прогреть в термостате при 65°С 5 минут. Перемешать на vortexe и поместить в центрифугу при 15 тыс. об/мин на 1 мин.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.

(Общий объем реакции - 25 мкл, объем НК-пробы – 10 мкл)

Порядок работы:

1. Отобрать и подписать необходимое количество микропробирок на 0,2 мл (клинические образцы + положительный контроль ПЦР + отрицательный контроль ПЦР).
2. Приготовить реакционную смесь. Для этого в отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-2-ДНК, полимеразу (TaqF) и ПЦР-смесь-1-СупроCan. Объем смесей и полимеразы зависит от числа клинических образцов + контроль, из расчета на одну пробу необходимо добавить **9,5 мкл ПЦР-смесь-2-ДНК + 0,5 мкл полимеразы (TaqF) + 5 мкл ПЦР-смесь-1-СупроCan**. Для простоты расчетов воспользуйтесь таблицей 1.

Таблица 1.

Количество образцов	ПЦР-смесь-2-ДНК мкл	Полимераза (TaqF) мкл	ПЦР-смесь-1-СупроCan
1	9,5	0,5	5
10	95	5	50
20	190	10	100
30	285	15	150
40	380	20	200
50	475	25	250
60	570	30	300
70	665	35	350
80	760	40	400
90	855	45	450
100	950	50	500

3. Внести в микропробирку по 15 мкл **готовой реакционной смеси**. Неиспользованные остатки реакционной смеси утилизировать.
4. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавить **10 мкл НК-пробы** в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
5. Для каждой постановки необходимо внести 2 контроля ПЦР: **отрицательный контроль** – в пробирку внести 10 мкл **Отрицательного контроля ПЦР**; **положительный контроль** амплификации – в пробирку внести **10 мкл положительного контроля «СупроCan»**
6. Установить пробирки в реакционный модуль.
7. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.
8. Установить в программе анализатора следующие параметры амплификации:
 1. 95°С – 15 минут
 2. 95°С – 15 секунд
 - 60°С – 20 секунд
 Количество циклов – 45.
9. Флуоресценцию измеряют при 60 °С на каналах HEX (JOE) и FAM.
9. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные - кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам - анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме реального времени. По каналу HEX регистрируют накопление продукта амплификации участка ДНК возбудителя криптоспоридиоза собак - *Cryptosporidium canis*, а по каналу FAM оценивают внутренний контроль. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов (см. описание для данного прибора).

УСЛОВИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

1. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и выделения НК (см. Таблицу).

Контроли	Контролируемый этап	Результат по значению Сt	
		Канал «HEX»	Канал «FAM»
Отрицательный контроль	Выделение НК	отсутствует	<35 (положительный)
Положительный контроль	ПЦР	<40 (положительный)	<35 (положительный)
Отрицательный контроль	ПЦР	отсутствует	отсутствует

2. Образец считается положительным, если на канале HEX (JOE) получено значение Сt менее 40, при этом значение Сt на канале FAM менее 35.
3. Образец считается отрицательным, если на канале HEX (JOE) отсутствует значение Сt или получено значение Сt более 40, при этом значение Сt на канале FAM менее 35.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. В пробе с положительным контролем отсутствует сигнал. Возможная причина ошибки связана с приготовлением реакционных смесей. Необходимо приготовить реакционные смеси заново.
2. Для клинического образца отсутствует сигнал по двум каналам, при этом контроли ПЦР соответствуют установленным в инструкции требованиям. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибированию ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
3. В отрицательном контроле (выделения или ПЦР) детектируется положительный сигнал. Возможная причина в контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ОБЕЗРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток. При получении разукруплять.

Хранение. Комплекты реагентов «Зайцев+® EXT» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект «ПЦР-CryptoCan» при длительном хранении хранить при температуре не выше минус 15 °С. При ежедневном использовании комплекта «ПЦР-CryptoCan» все его компоненты, кроме полимеразы (TaqF), хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 15 °С.

Рекламации на качество набора реагентов «Зайцев+® CryptoCan» направлять по адресу предприятия-изготовителя ООО «Зайцев+»: 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 9, стр. 8, 2 этаж, тел. 8(495) 150-08-07, <http://pcr-kit.ru>, e-mail: vetlabplus@gmail.com