

УТВЕРЖДАЮ »

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« _____ » _____ 20 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК бактерий рода
Шигелла (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC),
Сальмонелла (*Salmonella* spp.), термофильных
Кампилобактерий (*Campylobacter* spp.) в объектах
окружающей среды и клиническом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией
**«АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./
Campylobacter spp.-FL»**

«СОГЛАСОВАНО»

И.о. директора ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора

« 9 »

12

Мовсисянц А.А.
2009 г.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«14» 12 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК бактерий рода
Шигелла (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC),
Сальмонелла (*Salmonella* spp.), термофильных
Кампилобактерий (*Campylobacter* spp.) в объектах
окружающей среды и клиническом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией
**«АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./
Campylobacter spp.-FL»**

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ...	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	9
ВАРИАНТ FER	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	11
А. ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АМПЛИФИКАЦИИ	11
Б. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	13
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	14
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
ВАРИАНТ FRT	17
СОСТАВ	17
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	17
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	18
А. ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ	18
Б. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	20
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	21
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
В-	- отрицательный контроль этапа экстракции ДНК/РНК
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./*Campylobacter* spp.-FL» предназначен для выявления и дифференциации ДНК бактерий рода *Шигелла* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Сальмонелла* (*Salmonella* spp.), термофильных *Кампилобактерий* (*Campylobacter* spp.) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора («ДНК-сорб-В» или «РИБО-преп»). При экстракции ДНК из исследуемых образцов используется только РНК-элюент, входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./*Campylobacter* spp.-FL».

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Шигелла* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Сальмонелла* (*Salmonella* spp.), термофильных *Кампилобактерий* (*Campylobacter* spp.) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракция (выделение) ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного

образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Пробы ДНК используются для амплификации участка ДНК перечисленных выше возбудителей при помощи специфичных к этому участку ДНК-праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые 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. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте

Вариант FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации и дифференциации ДНК шигелл (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), сальмонелл (*Salmonella* spp.), термофильных кампилобактерий (*Campylobacter* spp.) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» или по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Для элюции ДНК на этапе выделения должен использоваться только РНК-элюент, входящий в данный ПЦР-комплект.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Патоген	Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
<i>Шигелла</i> (<i>Shigella</i> spp.) и энтероинвазивные <i>E. coli</i> (EIEC)	Фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³ ГЭ/мл
<i>Сальмонелла</i> (<i>Salmonella</i> spp.)	Фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³ ГЭ/мл
Термофильные Кампилобактерии (<i>Campylobacter</i> spp.)	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³ ГЭ/мл

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов:

Коллекция ГИСК им. Л.А. Тарасевича штаммы энтеровирусов (Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio (Sabin) I, II, III). Также тестировались аденовирусы серогрупп 5 и 7; вирусы гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), В, риновирусы, RS вирусы, аденовирусы человека – 3, 5, 7, 37, 40 типов.

Коллекция ФГУ ВГНКИ: *Salmonella enteritidis* S-6, *Salmonella choleraesuis* 370, *Salmonella typhimurium* 371, *Salmonella dublin* 373, *Salmonella typhi* C1, *Salmonella abortusovis* 372, *Salmonella gallinarum-pullorum*, *Shigella flexneri* 851b, *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* 25936, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 43435, *Clebsiella* K 65 SW4, *Listeria monocitogenes* YCXЧ 19, *Listeria monocitogenes* YCXЧ 52, *Proteus vulgaris* 115/98, *Pseudomonas aeruginosa* ДН c1, *Staphylococcus aureus* 653, *Staphylococcus aureus* 29112, *Morganella Morganii* 619 c 01, *Enterobacter faecalis* 356

Коллекция Центра контроля и профилактики заболеваний (CDC, США): 44 изолята норовирусов различных генетических кластеров 1 и 2 генотипа, 40 штаммов ротавирусов различных [P]G типов, 19 штаммов астровирусов 1, 2, 4, 5, 8 серотипов и 15 штаммов аденовирусов различных типов и следующие бактериальные штаммы (см. табл. 1).

Панель бактериальных агентов
Центра контроля и профилактики заболеваний (CDC, США)

Strain ID	Organism	Strain ID	Organism
K2033	<i>Salmonella</i> Ser. Grumpensis	K2015	<i>Salmonella</i> Ser. Oranienburg
K1806	<i>Salmonella</i> Ser. Newport	AM0114	<i>Salmonella</i> Ser. Newport
K2077	<i>Salmonella</i> Ser. Enteriditis	4	<i>Salmonella</i> Ser. Newport
83-99	<i>Salmonella</i> Ser. Typhimurium	K1810	<i>Salmonella</i> Ser. Anatum
PS505	<i>Shigella boydii</i>	K1991	<i>Salmonella</i> Ser. Typhimurium
PS408	<i>Shigella sonnei</i>	K1898	<i>Salmonella</i> Ser. Heidelberg
B4003	<i>Shigella sonnei</i>	PS555	<i>Shigella boydii</i>
PS801	<i>Shigella dysenteriae</i>	F6446	<i>Shigella dysenteriae</i>
C898	<i>Shigella dysenteriae</i> type 1	S821X1	<i>Shigella dysenteriae</i> type 1
F2035	<i>Shigella flexneri</i>	S177X1	<i>Shigella dysenteriae</i> type 1
E2539-C1	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	S3314	<i>Shigella dysenteriae</i> type 2
H10407	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	PS071	<i>Shigella flexneri</i>
F1008	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	PS050	<i>Shigella flexneri</i>
EDL 933	Shiga-toxin <i>E. coli</i> (STEC)	F7862	<i>Shigella flexneri</i>
3543-01	Shiga-toxin <i>E. coli</i> (STEC)	TX1	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)
4752-71	<i>Proteus vulgaris</i>	3525-01	Shiga-toxin <i>Escherichia coli</i> (STEC)
QA/QC	<i>Citrobacter freundii</i>	25922	<i>Escherichia coli</i> O6:H1
QA/QC	<i>Aeromonas</i>	621-64	<i>Citrobacter freundii</i>
3043-74	<i>Serratia marcescens</i>	3910-68	<i>Aeromonas</i> spp.
QA/QC	<i>Serratia marcescens</i>	E9113	<i>Vibrio cholerae</i>
F7894	<i>Vibrio vulnificus</i>	501-83	<i>Edwardsiella</i> spp.
F8515	<i>Yersinia enterocolitica</i>	587-82	<i>Providencia stuartii</i>
F8510	<i>Yersinia enterocolitica</i>	27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
K4299	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	D4989	<i>Helicobacter cinaedi</i>
F9835	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	D6827	<i>Helicobacter pullorum</i>
K2023	<i>Salmonella</i> Ser. Kentucky	D5127	<i>Helicobacter pylori</i>
K1684	<i>Salmonella</i> 4,12:1:-	D2686	<i>Arcobacter butzleri</i>
		-	-

При проведении тестирования данных панелей, а также образцов ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при

исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Спецификация по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-036-01897593-2009), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).

6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

При детекции «по конечной точке»:

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), «Gradient Palm Cyclер» («Corbett Research», Австралия), «MAXYGENE» («Ахуген», США), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») или аналогичные).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (плоская крышка, нестрипованные) на 0,2 или 0,5 мл:
 - а) объемом 0,2 мл (например, «Ахуген», США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл («Gradient Palm Cyclер», «GeneAmp PCR System 2700», «MAXYGENE» и др.);
 - б) объемом 0,5 мл (например, «Ахуген», США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.).

При детекции в режиме «реального времени»:

1. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F (например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия), «iQ5» («Bio-Rad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
2. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).
 - б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат образцы фекалий, концентраты образцов воды, подготовленные в соответствии с МУК 4.2.2029-05. «Методические указания по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов».

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Концентраты образцов воды не требуют специальной подготовки для экстракции ДНК. Подготовка образцов фекалий проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ВАРИАНТ FEP**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F - комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК бактерий рода *Шигелла* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Сальмонелла* (*Salmonella* spp.), термофильных *Кампилобактерий* (*Campylobacter* spp.) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Shigella</i> spp./ <i>Salmonella</i> spp.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter</i> spp./STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	2 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Shigella sonnei</i> / <i>Salmonella</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Campylobacter jejuni</i> и STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения и РНК-элюент для экстракции ДНК:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация ДНК.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для экстракции ДНК из клинического материала («ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

ВНИМАНИЕ! При экстракции ДНК из исследуемых образцов используется только РНК-элюент, входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./ *Campylobacter* spp.-FL».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

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

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Компоненты реакционных смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 2). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок «Фон» для каждого типа смеси). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов ДНК и пробирок «Фон». Тип пробирок, стрипов или планшетов выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Shigella* spp./*Salmonella* spp., или ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Campylobacter* spp./STI), ПЦР-смесь-2-FRT (см. табл. 2). Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

4. Приготовить 4 пробирки «Фон» (по две для каждого типа реакционной смеси). Для этого внести по **15 мкл** приготовленных смесей (без полимеразы (TaqF)) каждой в две пробирки «Фон», добавить по **10 мкл ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
 5. В оставшиеся части реакционных смесей добавить **полимеразу (TaqF)** в количестве см. табл. 2. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
- ВНИМАНИЕ!** Количество добавляемой в реакционную смесь полимеразы (TaqF), указанное в табл. 2, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».
6. Внести в оставшиеся пробирки по 15 мкл готовых реакционных смесей. Сверху раскапать по 1 капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Таблица 2

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

		Объем реагентов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10.00	5.00	0.50
Число исследуемых образцов	Число реакций ¹	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT, мкл	ПЦР-смесь-2-FRT, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
2	8	80	40	3.0
4	10	100	50	4.0
6	12	120	60	5.0
8	14	140	70	6.0
10	16	160	80	7.0
12	18	180	90	8.0
14	20	200	100	9.0
16	22	220	110	10.0
18	24	240	120	11.0
20	26	260	130	12.0
22	28	280	140	13.0
24	30	300	150	14.0
26	32	320	160	15.0
28	34	340	170	16.0

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемой полимеразы (TaqF) указано с вычетом двух пробирок «Фон».

¹ Число исследуемых образцов + контроль этапа выделения ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + 2 пробирки «Фон» + запас на один образец (N+1+2+2+1, где N-количество клинических образцов).

7. Используя наконечники с фильтром, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

8. Поставить **контрольные реакции амплификации:**

- а) **отрицательный контроль (К-) –** внести в пробирки с реакционной смесью **10 мкл ДНК-буфера;**
- б) **положительный контроль (К+ *Shigella/Salmonella*) –** внести в пробирки **10 мкл ПКО ДНК *Shigella sonnei/Salmonella* для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Shigella spp./ Salmonella spp*;**
- в) **положительный контроль (К+ *Campylobacter*/STI) –** внести в пробирки **10 мкл ПКО ДНК *Campylobacter jejuni*/STI для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter spp./STI*.**

Б. Проведение амплификации

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси, ДНК-пробы и контролей! Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 мин.

Запустить на амплификаторе программу.

Таблица 3

Программа амплификации

	Амплификаторы с активным регулированием ²			Амплификаторы с активным регулированием ³			Амплификаторы с матричным регулированием ⁴		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95°C	пауза		95°C	пауза		95°C	пауза	
1	95 °C	15 мин	1	95 °C	15 мин	1	95 °C	15 мин	1
2	95 °C	10 с	42	95 °C	10 с	42	95 °C	1 мин	42
	60 °C	10 с		60 °C	25 с		60 °C	1 мин	
	72 °C	10 с		72 °C	25 с		72 °C	1 мин	
3	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1
4	10 °C	хранение		10 °C	хранение		10 °C	хранение	

1. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

² Например, «Терцик» («ДНК-Технология»), «GeneAmp PCR System 2400» («Perkin Elmer»)

³ Например, «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «GeneAmp PCR System 2700» («Perkin Elmer»)

⁴ Например, «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research»), «Uno-2» («Biometra»)

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам.

Таблица 4

**Схема соответствия тестируемых патогенов
и каналов флуоресцентной детекции**

Канал детекции	ПЦР-смесь-1 FEP/FRT <i>Shigella</i> spp./ <i>Salmonella</i> spp.	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter</i> spp./STI
FAM/Green	ДНК <i>Shigella</i> spp.	ДНК <i>Campylobacter</i> spp.
JOE/Yellow/HEX	ДНК <i>Salmonella</i> spp.	ВКО

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 5.

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь -1	Результат по уровню флуоресценции		Результат
	FAM/Green	JOE/Yellow/HEX	
ПЦР-смесь-1- FEP/FRT <i>Shigella</i> spp. / <i>Salmonella</i> spp.	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Shigella</i> spp.
	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Salmonella</i> spp.
	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК <i>Shigella</i> spp. и ДНК <i>Salmonella</i> spp. ⁵
	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Shigella</i> spp. и ДНК <i>Salmonella</i> spp.
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter</i> spp./STI	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp.
	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе не выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp.
	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Проба требует повторного перевыделения и тестирования на всех ПЦР-смесях 1
	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp.

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата он расценивается как **невалидный** или **сомнительный**, и требует повторения ПЦР-исследования соответствующего исследуемого образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с табл. 7.

⁵ при значении флуоресценции Выше порогового значения по каналу HEX при использовании ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter* / STI.



Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап	Канал FAM/Green	Канал JOE/Yellow/HEX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Shigella</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.	B-	Экстракция ДНК	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	K+ <i>Shigella/Salmonella</i>	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter</i> spp./STI	B-	Экстракция ДНК	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата
	K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	K+ <i>Campylobacter</i> /STI	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX и FAM/Green ниже порогового значения положительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX и FAM/Green был ниже порогового значения положительного результата на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (B-) (кроме канала JOE/Yellow/HEX для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter* STI и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX или FAM/Green выше порогового значения положительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа выделения (экстракции) ДНК.



ВАРИАНТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F - комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК бактерий рода *Шигелла* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Сальмонелла* (*Salmonella* spp.), термофильных *Кампилобактерий* (*Campylobacter* spp.) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Shigella</i> spp./ <i>Salmonella</i> spp.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter</i> spp./STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	2 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Shigella sonnei</i> / <i>Salmonella</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Campylobacter jejuni</i> и STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения и РНК-элюент для экстракции ДНК:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 флакон
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для выделения ДНК из клинического материала («ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО-FL**).

ВНИМАНИЕ! При экстракции ДНК из исследуемых образцов используется только РНК-элюент, входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./*Campylobacter* spp.-FL».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 7). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+) и отрицательного контроля (К-) для каждого типа смеси). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок, стрипов или планшета выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Shigella* spp./*Salmonella* spp., или ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Campylobacter* spp./STI), ПЦР-

смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF) (см. табл. 7). Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей.

Таблица 7

**СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ
В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

		Объем реактивов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10.00	5.00	0.50
Число исследуемых образцов	Число реакций ⁶	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT, мкл	ПЦР-смесь-2-FRT, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
2	6	60	30	3.0
4	8	80	40	4.0
6	10	100	50	5.0
8	12	120	60	6.0
10	14	140	70	7.0
12	16	160	80	8.0
14	18	180	90	9.0
16	20	200	100	10.0
18	22	220	110	11.0
20	24	240	120	12.0
22	26	260	130	13.0
24	28	280	140	14.0
26	30	300	150	15.0
28	32	320	160	16.0

5. Используя наконечники с фильтром, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

6. Поставить **контрольные реакции амплификации:**

- а) **отрицательный контроль (К-)** – внести в пробирки с реакционной смесью **10 мкл ДНК-буфера;**

⁶ Число исследуемых образцов + контроль этапа выделения ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + запас на один образец (N+1+2+1, где N-количество клинических образцов).

- б) **положительный контроль (K+ *Shigella/Salmonella*)** – внести в пробирки **10 мкл** ПКО ДНК *Shigella sonnei/Salmonella* для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Shigella spp./ Salmonella spp*;
- в) **положительный контроль (K+ *Campylobacter*/STI)** – внести в пробирки **10 мкл** ПКО ДНК *Campylobacter jejuni*/STI для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter spp./STI*.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9 и Методические Рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Shigella spp.* и EIEC/*Salmonella spp./Campylobacter spp.-FL*»).

Таблица 8

Программа амплификации приборов роторного типа⁷

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

Таблица 9

Программа амплификации для приборов планшетного типа⁸

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM, HEX	
	72	10 с	–	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и JOE/Yellow/HEX (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и учету результатов.

⁷ Например, «RotorGene 3000» и «RotorGene 6000» («Corbett Research», Австралия)

⁸ Например, «iQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Cepheid», США)

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам FAM/Green и JOE/Yellow/HEX.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 10.

Таблица 10

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Канал детекции	ПЦР-смесь-1 FEP/FRT <i>Shigella spp./Salmonella spp.</i>	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter/STI</i>
FAM/Green	Определено значение меньше граничного – обнаружена ДНК <i>Shigella spp.</i>	Определено значение меньше граничного – обнаружена ДНК <i>Campylobacter spp.</i>
	Значение отсутствует или больше граничного – ДНК <i>Shigella spp.</i> не обнаружена ⁹	Значение отсутствует или больше граничного – ДНК <i>Campylobacter spp.</i> не обнаружена ⁹
JOE/ Yellow/HEX	Определено значение меньше граничного – обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i>	Определено значение меньше граничного – результаты тестирования образца валидны
	Значение отсутствует или больше граничного – ДНК <i>Salmonella spp.</i> не обнаружена ⁹	Значение отсутствует или больше граничного – результаты тестирования образца невалидны ¹⁰

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 11).

⁹ При значении Ct по каналу JOE/ Yellow/HEX для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter / STI* меньше граничного.

¹⁰ Если значение Ct по каналу JOE/ Yellow/HEX для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter / STI* отсутствует или больше граничного, то отрицательный результат анализа при использовании других ПЦР-смесей-1 считается невалидным и необходимо провести повторный ПЦР-анализ данного исследуемого образца, начиная с этапа выделения.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап	Канал FAM/Green	Канал JOE/Yellow/HEX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Shigella</i> spp. / <i>Salmonella</i> spp.	B-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
	K-	ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
	K+ <i>Shigella</i> / <i>Salmonella</i>	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter</i> spp./STI	B-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует или больше граничного	Определено значение меньше граничного
	K-	ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
	K+ <i>Campylobacter</i> / STI	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

- Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX и FAM/Green ниже порогового значения положительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX и FAM/Green, был ниже порогового значения положительного результата на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (B-) (кроме канала JOE/Yellow/HEX для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter*/STI и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX или FAM/Green выше порогового значения положительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа выделения (экстракции) ДНК.



СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

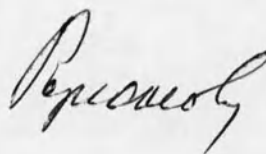
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С (кроме ПЦР-смеси-1 FEP/FRT *Shigella* spp./*Salmonella* spp., ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Campylobacter* spp./STI, ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)). ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Shigella* spp./*Salmonella* spp., ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Campylobacter* spp./STI, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./*Campylobacter* spp.-FL» направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний
Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК
им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора



Г.М.Игнатьев

102