

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин
« 14 » 20 20 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления возбудителей
бактериальных кишечных инфекций методом ПЦР
АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	12
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	16
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	18
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	20
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	22
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F).....	24
СОСТАВ	24
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	24
А. Подготовка проб для амплификации.....	25
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	26
В. Анализ и интерпретация результатов.....	27
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L).....	32
СОСТАВ	32
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	32
А. Подготовка проб для амплификации.....	32
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	33
В. Анализ и интерпретация результатов.....	35
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	39
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	40
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	41
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.	42

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
EHEC	- энтерогеморрагические <i>E. coli</i>
EIEC	- энтероинвазивные <i>E. coli</i>
PBS	- фосфатно-солевой буфер

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления возбудителей бактериальных кишечных инфекций методом ПЦР АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения ДНК микроорганизмов:

- комплекса шигелла (*Shigella* spp.) / энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) (без дифференцировки),
 - рода сальмонелла (*Salmonella* spp.),
 - комплекса энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC) / *S. dysenteriae* I типа,
 - термофильных кампилобактерий (*Campylobacter* spp.),
- в биологическом материале (фекалии) и объектах окружающей среды (концентраты образцов воды) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов не позволяет дифференцировать *S. dysenteriae* I типа от присутствия в исследуемом образце сочетания *Shigella* spp. / EIEC и EHEC. Для дифференциации

S. dysenteriae I типа необходимо использовать бактериологические методы.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на кишечную инфекцию вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для исследования объектов окружающей среды для профилактики заболеваний, вызванных определяемыми микроорганизмами.

Противопоказания отсутствуют.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов (*Shigella* spp. / *EIEC*, *Salmonella* spp., *EHEC* / *S. dysenteriae* I типа, *Campylobacter* spp.) и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. 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 реакция амплификации участков ДНК выявляемых

микроорганизмов при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемых ДНК-мишеней, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов 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 УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50°C и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся пять реакций – амплификация ДНК комплекса шигелл (*Shigella* spp.) / энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) (без дифференцировки), сальмонелл (*Salmonella* spp.), термофильных кампилобактерий (*Campylobacter* spp.), комплекса энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC) / *S. dysenteriae* I типа, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК выявляемых микроорганизмов, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК комплекса шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC)	ДНК энтерогеморрагических <i>E. coli</i> (EHEC) / <i>S. dysenteriae</i> I типа*	ДНК сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.)	ДНК ВКО-FL	ДНК термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.)
Область амплификации	IpaH (инвазионный плазмидный антиген)	stx1 и stx2 (ген Шигаподобного токсина-1 и ген Шигаподобного токсина-2)	Ttr (ген тиоционат редуктазы)	искусственная нуклеотидная последовательность	23SrRNA

* При наличии в исследуемом образце ДНК *S. dysenteriae* I типа будет получен положительный сигнал по каналам для флуорофоров FAM и JOE одновременно. Набор реагентов не позволяет дифференцировать *S. dysenteriae* I типа от присутствия в исследуемом образце сочетания патогенов *Shigella* spp. / EIEC и EHEC.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Микроорганизм	Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл ¹
Шигеллы (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивные <i>E. coli</i> (EIEC)	концентраты образцов воды, фекалии	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	1×10^3
Сальмонеллы (<i>Salmonella</i> spp.)	концентраты образцов воды, фекалии	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	1×10^3
Термофильные кампилобактерии (<i>Campylobacter</i> spp.)	концентраты образцов воды	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	1×10^3
	фекалии	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	5×10^3
Энтерогеморрагические <i>E. coli</i> (EHEC) / <i>S. dysenteriae</i> I типа	концентраты образцов воды, фекалии	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	1×10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК заявленных микроорганизмов при исследовании штаммов следующих микроорганизмов:

- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC® 14028™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Braenderup* ATCC® BAA-664™, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC® 43435™, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

¹ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца исследуемого материала.

ATCC® 33560™, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC® BAA1153™, *Campylobacter jejuni* ATCC® BAA-2151™, *Campylobacter coli* ATCC® 49941™, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC® 49943D-5™, *Escherichia coli* ATCC® BAA-2326™ O104H4;

- штаммы из коллекции ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Escherichia coli* O157H7 ГКПМ 61, *Escherichia coli* O157H7 ГКПМ 214, *Escherichia coli* O143 ГКПМ 240209, *Escherichia coli* O124 № 227 ГКПМ 240187, *Escherichia coli* O144 ГКПМ 240210;
- панель WHO EQAS 2011 (World Health Organisation External Quality Assurance Services) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: штаммы *Salmonella* serovar *Abaetetuba* WHO S11.8, *Salmonella* serovar *Westhampton* WHO S11.2, *Salmonella* serovar *Muenchen* WHO S11.1, *Salmonella* serovar *Havana* WHO S11.5, *Salmonella* serovar *Derby* WHO S11.4, *Salmonella* serovar *Onireke* WHO S11.6;
- штаммы *Escherichia coli* O145H28 Genebank JX112708.1, *Escherichia coli* O145H28 Genebank JX112707.1 в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл;
- клинические изоляты, видовая принадлежность которых подтверждена полногеномным секвенированием генома, в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* EnteroBase SRR7660973, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* EnteroBase SRR7660873, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* EnteroBase SRR7660866, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* EnteroBase SRR7660942, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* EnteroBase SRR7660849, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* EnteroBase SRR7660900, *Shigella flexneri* 851b (1270), *Shigella sonnei* 1721.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих штаммов микроорганизмов:

- штамм из коллекции NCTC (National Collection of Type Cultures, Великобритания) *Escherichia coli* NCTC 9001 в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл;

- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 4617™, *Bordetella pertussis* ATCC® 9340™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Candida guilliermondii* ATCC® 6260™, *Candida krusei* ATCC® 14243™, *Clostridium difficile* ATCC® 9689™, *Clostridium septicum* ATCC® 12464™, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium xerosis* ATCC® 373™, *Eggerthella lenta* (*Eubacterium lentum*) ATCC® 43055™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Enterococcus faecalis* (vancomycin resistant) ATCC® 51299™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC® 19414™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Escherichia coli* ATCC® 35218™, *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 9006™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211™, *Haemophilus parainfluenzae* ATCC® 7901™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Listeria grayi* (*murrayi*) ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC® 25238™, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC® 8176™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Propionibacterium acnes* ATCC® 11827™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Rhodococcus equi* ATCC® 6939™, *Serratia marcescens* ATCC® 14756™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 43300™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33862™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 33591™, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 12600™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Staphylococcus haemolyticus*

ATCC® 29970™, *Staphylococcus saprophyticus*
 ATCC® 49907™, *Stenotrophomonas maltophilia*
 ATCC® 13637™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386™,
Streptococcus agalactiae ATCC® 13813™, *Streptococcus*
equisimilis ATCC® 12388™, *Streptococcus equi* subsp. *equi*
 ATCC® 9528™, *Streptococcus bovis* (Group D) ATCC® 9809™,
Streptococcus mutans ATCC® 35668™, *Streptococcus*
pneumoniae ATCC® 49619™, *Streptococcus pneumoniae*
 ATCC® 6303™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336™,
Streptococcus pneumoniae ATCC® 6305™, *Streptococcus*
pyogenes ATCC® 19615™, *Streptococcus salivarius*
 ATCC® 13419™, *Streptococcus uberis* ATCC® 700407™, *Vibrio*
parahaemolyticus ATCC® 17802™, *Vibrio vulnificus*
 ATCC® 27562™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25240™,
Corynebacterium minutissimum ATCC® 23348™;

- штаммы из коллекции ГКПМ (Государственной коллекции патогенных микроорганизмов) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Escherichia coli* O86 № 990 ГКПМ 240144, *Escherichia coli* O125 Canioni ГКПМ 240188, *Escherichia coli* O85 ГКПМ 240141, *Escherichia coli* O61 10167b-41 240118, *Escherichia coli* O59 9095-41 ГКПМ 240116, *Escherichia coli* O34 ГКПМ 240088, *Escherichia coli* K12 ГКПМ 240367, *Escherichia coli* O6 ГКПМ 240015, *Escherichia coli* O111 ГКПМ 240170, *Escherichia coli* O62 10524-41 ГКПМ 240119, *Escherichia coli* O126 № 611 ГКПМ 240190, *Escherichia coli* O57 8198-41 ГКПМ 240115;
- штаммы аденовирусов человека – 3 типа (GenBank: FJ167580.1), 5 типа (GenBank: FJ167596.1), 7 типа (GenBank: KU361344.1), 37 типа (GenBank: AY048776.1), 40 типа (GenBank: FJ167570.1), 41 типа (GenBank: FJ167574.1) в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл (клинические изоляты, специфичность подтверждена прямым секвенированием нуклеотидных последовательностей).

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и образцов ДНК человека (0,2 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США) неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость, воспроизводимость

Повторяемость и воспроизводимость были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартные образцы предприятия содержащие ДНК *Shigella species*, ДНК *Campylobacter species*, ДНК *Salmonella species*, ДНК *EHEC 1*, ДНК *EHEC 2* с концентрациями 1×10^3 ГЭ/мл каждого, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО. Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования и разных серий набора реагентов.

Результаты для повторяемости, внутрисерийной воспроизводимости и межсерийной (межлабораторной) воспроизводимости представлены в табл. 3.

Таблица 3

АмплиСенс® ОКИ бакто- скрин-FL	Образцы	Повторяемость		Внутрисерийная воспроизводимость		Межсерийная (межлабораторная) воспроизводимость	
		Совпадение результатов с ожидаемыми	Совпадение результатов, %	Совпадение результатов с ожидаемыми	Совпадение результатов, %	Совпадение результатов с ожидаемыми	Совпадение результатов, %
Форма 1	<i>Shigella spp/EIEC</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	<i>Campylobacter spp</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	<i>Salmonella spp</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	<i>EHEC</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	Отрицательные	10/10	100	20/20	100	20/20	100
Форма 2	<i>Shigella spp/EIEC</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	<i>Campylobacter spp</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	<i>Salmonella spp</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	<i>EHEC</i>	10/10	100	20/20	100	20/20	100
	Отрицательные	10/10	100	20/20	100	20/20	100

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL			Результаты применения референтного метода ²	
				положительных	отрицательных
Фекалии	Всего исследовано 1134 образца	Shigella spp. / EIEC	положительных	205	0
			отрицательных	1	928
		EHEC / S. dysenteriae I типа	положительных	176	1
			отрицательных	2	955
		Salmonella spp.	положительных	166	0
			отрицательных	0	968
		Campylobacter spp.	положительных	268	2
			отрицательных	7	857
Концентраты образцов воды	Всего исследовано 652 образца	Shigella spp. / EIEC	положительных	209	0
			отрицательных	1	442
		EHEC / S. dysenteriae I типа	положительных	211	0
			отрицательных	1	440
		Salmonella spp.	положительных	208	0
			отрицательных	0	444
		Campylobacter spp.	положительных	211	0
			отрицательных	2	439

Были использованы:

- 986 образцов фекалий от пациентов из очагов групповой и спорадической заболеваемости шигеллезом, сальмонеллезом, кампилобактериозом и энтерогеморрагическим эшерихиозом. Отрицательные по содержанию бактериальных патогенов образцы фекалий получены от пациентов контрольной группы без диареи в анамнезе (100 образцов).
- 44 модельных образца фекалий, контаминированных ДНК *S. dysenteriae* I типа в концентрации от 1×10^6 до 1×10^8 ГЭ/мл.
- 4 модельных образца фекалий, контаминированных ДНК *Shigella* spp. в концентрации от 1×10^6 до 1×10^8 ГЭ/мл.

² В качестве референтного метода использовались наборы реагентов «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» (ПУ № ФСР 2008/02265), «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (ПУ № ФСР 2010/07977).

- 234 пробы концентратов образцов воды, полученных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в период 2015-2019 гг.
- 418 модельных образцов концентратов воды, контаминированных бактериальными патогенами в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл.

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL**

Выявляемый патоген	Тип образцов	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 % в интервале), %	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 % в интервале), %
<i>Shigella</i> spp. / <i>EIEC</i>	Фекалии	99,5 % (98,5 – 100)	100% (99,7 – 100)
	Концентраты образцов воды	99,5% (98,6 – 100)	100% (99,3 – 100)
<i>EHEC</i> / <i>S. dysenteriae</i> I типа	Фекалии	98,8% (98,3 – 100)	99,9% (99,7 – 100)
	Концентраты образцов воды	99,5% (98,6 – 100)	100% (99,3 – 100)
<i>Salmonella</i> spp.	Фекалии	100% (98,2 – 100)	99,9% (99,7 – 100)
	Концентраты образцов воды	100% (98,6 – 100)	100% (99,3 – 100)
<i>Campylobacter</i> spp.	Фекалии	97,5% (98,9 – 100)	99,8% (99,7 – 100)
	Концентраты образцов воды	99,1% (98,6 – 100)	100% (99,3 – 100)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- 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, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, 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

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁶. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор 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. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

⁶ Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Аллергическая реакция отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», или аналогичный).

Предварительная подготовка исследуемого материала

2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
3. Глицерин для длительного хранения биологического материала (фекалий) в условиях низкотемпературной заморозки.
4. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
9. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

13. Комплекты реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В» (РУ № ФСР 2009/05220), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
14. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

15. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, 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.

16. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
17. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
19. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
20. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
21. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
22. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
23. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
24. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы биологического материала:

- образцы фекалий,
- образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды).

Образцы фекалий

Взятие образцов фекалий производится из одноразовой емкости (например, чашка Петри, одноразовый пластиковый пакет), помещенной в судно для дефекации или из одноразовых

подгузников (дети младшего возраста). При использовании одноразового подгузника у детей с водянистой консистенцией фекалий для получения достаточного количества образца в подгузник перед использованием помещают ватный тампон.

ВНИМАНИЕ! Не допускается забор образца фекалий непосредственно из судна для дефекации или другой емкости многократного использования (вне зависимости от методов их дезинфекции).

Пробу в количестве примерно 1 г (или 1 мл) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный пластиковый контейнер.

Допускается хранение образцов фекалий до проведения предобработки:

- при комнатной температуре от 18 до 25 °С — не более 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С — не более 1 суток.
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Концентраты образцов воды (для проведения ПЦР-исследования):

Взятие образцов воды производится в соответствии с МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов» и МУК 4.2.1018-01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» или актуальных версиях данных документов, действующих на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

Допускается хранение образцов концентратов воды до проведения ПЦР-исследования:

- 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.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

Концентраты образцов воды не требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий требуют предварительной подготовки.

Приготовление фекальной суспензии:

1. Отобрать одноразовые пробирки (объемом 1,5 мл) в количестве, соответствующем количеству проб. Внести по 1,0 мл PBS (при необходимости хранения суспензии более суток в условиях заморозки используют 15 – 20 % р-р глицерина в PBS).
2. В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) внести 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии. Оптимальная концентрация суспензии ~ 10 % (по объему осадка после центрифугирования). Сбросить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе (не более 10 сек).

Фекалии водянистой полупрозрачной консистенции используются для экспресс-фильтрации без предварительного получения суспензии.

Проведение экспресс-фильтрации фекальной суспензии (для детекции вирусных и бактериальных патогенов):

1. Для экспресс-фильтрации использовать два наконечника на 1 мл (один с фильтром, другой – без него) и отрезанную рабочую часть одноразового ватного зонда (ватной палочки).
2. В наконечник без фильтра вставить отрезанную рабочую часть одноразового ватного зонда (ватной палочки) и зафиксировать проталкиванием в суженную часть наконечника.
3. Наконечником с фильтром забрать 1 мл фекальной суспензии, вставить его в подготовленный наконечник с ватным фильтром и под давлением провести фильтрацию в новую одноразовую пробирку. При затрудненной фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию фекальной суспензии.
4. Аликвоту фильтрата в объеме 100 мкл используют для экстракции нуклеиновых кислот.

Допускается хранение предобработанных образцов

суспензии фекалий до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (фекалии), используемом для исследования.

Были протестированы модельные образцы фекалий без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ (см. табл. 6). Модельные образцы фекалий содержали разведения стандартных образцов предприятия в концентрациях, соответствующих пределу обнаружения.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 40% (объем интерферента к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
	Фекальные жиры	15% (объем интерферента к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
	Муцин (слизь)	3% (вес препарата к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
Экзогенные вещества	«Лоперамид-Акрихин» («Акрихин», Россия)	до 5 мг/мл	Не обнаружено
	«Гидрокортизон» мазь для наружного применения 1% («НижФарм», Россия)	до 3% (вес препарата к объему исследуемого образца)	Не обнаружено

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 ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп». Порядок работы с комплектами реагентов «ДНК-сорб-В» и «РИБО-преп» смотрите в инструкциях к соответствующим комплектам для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-В» и «РИБО-преп»:

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

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

Объем элюции – **50 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F).

Объем элюции – **125 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

ВНИМАНИЕ! Для элюции при экстракции ДНК из исследуемых образцов с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» используется только буфер для элюции В, входящий в состав набора реагентов АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК микроорганизмов комплекса шигелла (*Shigella* spp.) / энтероинвазивных *E. Coli* (EIEC) (без дифференцировки), рода сальмонелла (*Salmonella* spp.), термофильных кампилобактерий (*Campylobacter* spp.), комплекса энтерогеморрагических *E. Coli* (EHEC) / *S. Dysenteriae* I типа с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ОКИ бакто-скрин	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
К+ ОКИ бакто-скрин	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Буфер для элюции В ⁷	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	3 пробирки

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

⁷ Реагент используется взамен реагента для элюции, входящего в состав комплекта для экстракции «РИБО-преп».

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL ОКИ бакто-скрин, 5 мкл ПЦР-буфера-В и 0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении 1**.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL ОКИ бакто-скрин**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL ОКИ бакто-скрин, ПЦР-буфером-В**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL ОКИ бакто-скрин, ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации,

необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ОКИ бакто-скрин**.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
- в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7, 8)⁸.

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁹ и планшетного¹⁰ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

⁸ Программы амплификации (табл 7, 8) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

⁹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹⁰ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁹ и планшетного типа¹⁰

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	
	72	10 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа (см. табл. 8) может применяться для всего комплекса наборов реагентов «АмплиСенс», предназначенных для выявления и дифференциации ДНК/РНК микроорганизмов, вызывающих острые кишечные инфекции, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 30 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Таблица 9

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. Coli</i> (EIEC)	ДНК энтерогеморрагических <i>E. Coli</i> (EHEC) / <i>S. Dysenteriae</i> I типа*	ДНК сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.)	ДНК ВКО-FL	ДНК термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.)

* При наличии в исследуемом образце ДНК *S. Dysenteriae* I типа будет получен положительный сигнал по каналам для флуорофоров FAM и JOE одновременно. Набор реагентов не позволяет дифференцировать *S. Dysenteriae* I типа от присутствия в исследуемом образце сочетания *Shigella* spp. / EIEC и EHEC.

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*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 10

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов*

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК шигелл (<i>Shigella</i> spp.) и энтероинвазивных <i>E. Coli</i> (EIEC) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК энтерогеморрагических <i>E. Coli</i> (EHEC) обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	обнаружена ДНК <i>S. Dysenteriae</i> I типа* или обнаружена ДНК шигелл (<i>Shigella</i> spp.) и энтероинвазивных <i>E. Coli</i> (EIEC) и ДНК энтерогеморрагических <i>E. Coli</i> (EHEC)
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК микроорганизмов НЕ обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**

* Для дифференциации *S. Dysenteriae* I типа необходимо использовать бактериологические методы.

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

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 11 и вкладываем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 11

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного
К–	ПЦР	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 11) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct) менее граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами 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 (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5.5

определено значение порогового цикла (C_t) менее граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами 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.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участков ДНК микроорганизмов комплекса шигелла (*Shigella* spp.) / энтероинвазивных *E. Coli* (EIEC) (без дифференцировки), рода сальмонелла (*Salmonella* spp.), термофильных кампилобактерий (*Campylobacter* spp.), комплекса энтерогеморрагических *E. Coli* (EHEC) / *S. Dysenteriae* I типа, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ОКИ бакто-скрин- Lyо	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл
К+ ОКИ бакто-скрин	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Буфер для элюции В ¹¹	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью ОКИ бакто-

¹¹ Реагент используется взамен реагента для элюции, входящего в состав комплекта для экстракции «РИБО-преп».

скрин-Люо для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).

2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ ОКИ бакто-скрин**.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
- в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 12, 13)¹².

¹² Программы амплификации (табл. 12, 13) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

Таблица 12

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
роторного¹³ и планшетного¹⁴ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 13

**Программа амплификации и детекции флуоресцентного
сигнала для приборов роторного¹³ и планшетного¹⁴ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	
	72	10 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа (см. табл. 13) может применяться для всего комплекса наборов реагентов «АмплиСенс», предназначенных для выявления и дифференциации ДНК/РНК микроорганизмов, вызывающих острые кишечные инфекции, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной

¹³ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹⁴ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 30 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Таблица 14

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC)	ДНК энтерогеморрагических <i>E. Coli</i> (EHEC) / <i>S. Dysenteriae</i> I типа*	ДНК сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.)	ДНК ВКО-FL	ДНК термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.)

* При наличии в исследуемом образце ДНК *S. Dysenteriae* I типа будет получен положительный сигнал по каналам для флуорофоров FAM и JOE одновременно. Набор реагентов не позволяет дифференцировать *S. Dysenteriae* I типа от присутствия в исследуемом образце сочетания *Shigella* spp. / EIEC и EHEC.

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) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 15

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов*

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК шигелл (<i>Shigella</i> spp.) и энтероинвазивных <i>E. Coli</i> (EIEC) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК энтерогеморрагических <i>E. Coli</i> (EHEC) обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	обнаружена ДНК <i>S. Dysenteriae</i> I типа* или обнаружена ДНК шигелл (<i>Shigella</i> spp.) и энтероинвазивных <i>E. Coli</i> (EIEC) и ДНК энтерогеморрагических <i>E. Coli</i> (EHEC)
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	больше или меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК микроорганизмов НЕ обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**

* Для дифференциации *S. Dysenteriae* I типа необходимо использовать бактериологические методы.

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

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 16 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 16

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

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР- исследо- вания	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного
K-	ПЦР	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t) менее граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами 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 (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct) менее граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами 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.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов 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. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения. Допускается хранение «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F без разуккомплектации при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления.

Хранение.

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

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь ОКИ бакто-скрин-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь ОКИ бакто-скрин-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru¹⁵.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

¹⁵ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Беречь от влаги

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Схема приготовления реакционных смесей при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

Объем реагента на одну реакцию, мкл		Объем реагентов на указанное количество реакций		
		10,00	5,00	0,50
Число исследуемых образцов	Число реакций ¹⁶	ПЦР-смесь-FL ОКИ бакто-скрин	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
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
30	34	340	170	17,0
32	36	360	180	18,0

¹⁶ Число исследуемых образцов + контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + запас на один образец (N+1+2+1, где N-количество исследуемых образцов).

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 42
сорок два лист а

Директор ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии
Роспотребнадзора

« 19 » 02 20 20 г.

В.Г. Акимкин

М.П.



Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов
для выявления возбудителей
бактериальных кишечных
инфекций методом ПЦР
АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL

Форма 1: **REF** H-2631-1
Форма 2: **REF** H-2632-1-4



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123, город
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



VER 14.02.20

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

«ДНК-сорб-В», «РИБО-преп».

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция ¹		
все образцы	50 мкл или	в каждую пробирку (для формы 1)
	125 мкл	в каждую пробирку (для формы 2)

¹ При экстракции с помощью «РИБО-преп» используется только буфер для элюции В, входящий в состав набора реагентов
А ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F

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

Контроли: 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (OK).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL ОКИ бакто-скрин**.
- В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL ОКИ бакто-скрин	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-В	$5 \cdot (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных проб:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, OK <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избежать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
K+ ОКИ бакто-скрин	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

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

Контроли: 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (OK).

- Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью ОКИ бакто-скрин-Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, OK <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избежать попадания сорбента в реакционную смесь!!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
K+ ОКИ бакто-скрин	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени»².

Программа амплификации					Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	30 мин	—	1	1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1	2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	45	3	95	10 с	—	45
	60	25 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5			60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	
	72	10 с	—						

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Программы амплификации могут применяться для всего комплекса наборов реагентов «АмплиСенс», предназначенных для выявления и дифференциации ДНК/РНК микроорганизмов, вызывающих острые кишечные инфекции, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из программы первый шаг обратной транскрипции (при 50 °C) для экономии времени. С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, помимо вышеуказанных.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Мишень для амплификации	ДНК шигелл (<i>Shigella</i> spp.) и энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC)	ДНК энтерогеморрагических <i>E. coli</i> (EHEC) / <i>S. dysenteriae</i> I типа*	ДНК сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.)	ДНК ВКО-FL	ДНК термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.)

При наличии в исследуемом образце ДНК *S. dysenteriae* I типа будет получен положительный сигнал по каналам для флуорофоров FAM и JOE одновременно. Набор реагентов не позволяет дифференцировать *S. dysenteriae* типа от присутствия в исследуемом образце сочетания *Shigella* spp. / EIEC и EHEC.

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (*Ct*), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.



Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3

(58) листов (-а)

Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.Г. Акимкин

« 18 » 02 2020 г. м.п.

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов
АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL

Форма 1 REF H-2631-1

Форма 2 REF H-2632-1-4

LOT

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate / Gain Optimisation... / Опт.уровня сигнала	Threshold / Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct / Коррект. уклон	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10 %
JOE/Yellow	от 3FI до 7FI	0,05	включена	включена	5 %
ROX/Orange	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10 %
Cy 5/Red	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10 %
Cy 5.5/Crimson	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	5 %

Примечание - В случае если кривые флуоресценции по каналам JOE/Yellow, Cy5.5/Crimson не соответствуют экспоненциальному росту (не имеют S-образный вид), допускается увеличение значения порога отрицательных проб (NTC threshold / Порог Фона - P_Ф) до 10 %.

Настройки для приборов планшетного типа

«ДТ-96», «ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/Порог положительного результата	Верхняя граница/Порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
С(Ср) для всех каналов	Пороговый (Сt)	Fam, Hex/R6G, ROX, Cy5, Cy5.5	90 %	10 StD	5 % F(Cp)	30 % F(Cp)	Не использовать	включено

Примечание — для каждого канала в логарифмической шкале установить пороговую линию на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов.

CFX96

Примечание — Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options*, задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate 2,5 °C/sec*.

Канал	Threshold/Porog
FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705	Последовательно для каждого канала в логарифмической шкале установить пороговую линию на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов К+ в последнем цикле амплификации.

Продолжение см. на обороте

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов
АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL

Форма 1 REF H-2631-1

Форма 2 REF H-2632-1-4

LOT

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate / Gain Optimisation... / Опт.уровня сигнала	Threshold / Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct / Коррект. уклон	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10 %
JOE/Yellow	от 3FI до 7FI	0,05	включена	включена	5 %
ROX/Orange	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10 %
Cy 5/Red	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10 %
Cy 5.5/Crimson	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	5 %

Примечание - В случае если кривые флуоресценции по каналам JOE/Yellow, Cy5.5/Crimson не соответствуют экспоненциальному росту (не имеют S-образный вид), допускается увеличение значения порога отрицательных проб (NTC threshold / Порог Фона - P_Ф) до 10 %.

Настройки для приборов планшетного типа

«ДТ-96», «ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/Порог положительного результата	Верхняя граница/Порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
С(Ср) для всех каналов	Пороговый (Сt)	Fam, Hex/R6G, ROX, Cy5, Cy5.5	90 %	10 StD	5 % F(Cp)	30 % F(Cp)	Не использовать	включено

Примечание — для каждого канала в логарифмической шкале установить пороговую линию на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов.

CFX96

Примечание — Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options*, задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate 2,5 °C/sec*.

Канал	Threshold/Porog
FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705	Последовательно для каждого канала в логарифмической шкале установить пороговую линию на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов К+ в последнем цикле амплификации.

Продолжение см. на обороте

Граничные значения порогового цикла *Ct*

Образец	Приборы роторного типа					Приборы планшетного типа				
	Канал для флуорофора									
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
OK	Ct отсутствует или >38			38	Ct отсутствует или >38	Ct отсутствует или >40			40	Ct отсутствует или >40
К+	38	38	38	38	38	40	40	40	40	40
К-	Ct отсутствует или >38					Ct отсутствует или >40				
Исследуемые образцы	38	38	38	38	38	40	40	40	40	40

Действующую версию Информационного листа «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)» Вы можете получить в формате PDF-файла по интернет-адресу <http://www.amplisens.ru> в разделе Информационные материалы/Руководства по работе с приборами.

Бумажный вариант документа Вы можете распечатать самостоятельно.

Пожалуйста, пользуйтесь всегда только актуальной версией документа с указанного интернет-сайта.

Граничные значения порогового цикла *Ct*

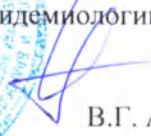
Образец	Приборы роторного типа					Приборы планшетного типа				
	Канал для флуорофора									
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
OK	Ct отсутствует или >38			38	Ct отсутствует или >38	Ct отсутствует или >40			40	Ct отсутствует или >40
К+	38	38	38	38	38	40	40	40	40	40
К-	Ct отсутствует или >38					Ct отсутствует или >40				
Исследуемые образцы	38	38	38	38	38	40	40	40	40	40

Действующую версию Информационного листа «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)» Вы можете получить в формате PDF-файла по интернет-адресу <http://www.amplisens.ru> в разделе Информационные материалы/Руководства по работе с приборами.

Бумажный вариант документа Вы можете распечатать самостоятельно.

Пожалуйста, пользуйтесь всегда только актуальной версией документа с указанного интернет-сайта.

Верно
Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
(два) листов (-а)
Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В.Г. Акимкин

« 11 » 02 20 20 г. м.п.