

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора

Кутырев В.В.
2021.



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
И УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
(ГЕНХОЛ – ИДЕНТИФИКАЦИЯ - РГФ) по ТУ 21.20.23-053-01898109-2016**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления и ускоренной идентификации холерных вибрионов методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (ГенХол - идентификация – РГФ)», далее - набор реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ», предназначен для выявления ДНК возбудителя холеры в пробах клинического материала и объектов окружающей среды с одновременным определением его эпидемической значимости, серогруппы, биовара и принадлежности холерных вибрионов биовара эльтор к генетически измененным вариантам по *ctxB* гену методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени.

Холера - особо опасное инфекционное заболевание с диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом передачи возбудителя инфекции, водным, пищевым и контактным путями распространения. Возбудитель холеры - холерный вибрион относится к семейству *Vibrionaceae*, роду *Vibrio* и виду *Vibrio cholerae*. *V. cholerae* по наличию специфического О-антигена распределяются на серологические группы. В настоящее время известно 206 серологических О-групп холерных вибрионов. Возбудителями холеры являются холерные вибрионы 01 и 0139 серологических групп, холерные вибрионы не 01/не 0139 серологических групп могут вызывать спорадические или групповые случаи диарей, не склонные к эпидемическому распространению. Холерные вибрионы в пределах 01 серогруппы делятся на два биовара: классический и эльтор, имеющих существенные фенотипические и генетические отличия. В последние годы во всем мире широкое распространение получили генетически измененные варианты холерных вибрионов биовара эльтор, которые характеризуются более высокой вирулентностью.

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования материала, полученного от лиц обоего пола любого возраста с подозрением на холеру вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания (больных, вибрионосителей, контактных), а также в ходе эпидемиологического мониторинга объектов окружающей среды, в том числе проб воды из поверхностных водоёмов, хозяйственно-бытовых и сточных вод, смывов с объектов окружающей среды, пищевых продуктов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Для проведения исследований могут быть использованы амплификаторы для ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени типа RotorGene (RG) и CFX.

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 12 реагентов:

№ п/п	Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
1.	ПЦР-смесь-эпид	Смесь праймеров, зондов, дНТФ и натрия азида - прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1 пробирка
2.	ПЦР-смесь-таксон	Смесь праймеров, зондов, дНТФ и натрия азида - прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1 пробирка
3.	ПЦР-смесь- B203C	Смесь праймеров, дНТФ и натрия азида – прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1 пробирка
4.	ПЦР-смесь- B203T	Смесь праймеров, дНТФ и натрия азида – прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1 пробирка
5.	ПЦР-смесь-РГФ	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl; калия хлорид; магния хлорид; Tween-20, глицерин, азид натрия	0,5	2 пробирки
6.	ПЦР-смесь-аллель	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl; калия хлорид; магния хлорид; Tween-20, глицерин, SYBRGreen, азид натрия	0,5	2 пробирки
7.	Тaq ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,08	1 пробирка
8.	ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl; Na ₂ -ЭДТА	1,0	3 пробирки
9.	ПКО ДНК <i>V. cholerae</i> -РГФ	препарат ДНК <i>V. cholerae</i> , сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	3 пробирки
10.	ПКО ДНК <i>ctxBeltor</i>	препарат ДНК <i>V. cholerae</i> , содержащей аллель <i>ctxBeltor</i> , сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	3 пробирки
11.	ПКО ДНК <i>ctxBclass</i>	препарат ДНК <i>V. cholerae</i> , содержащей аллель <i>ctxBclass</i> сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	3 пробирки
12.	Растворитель	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой Н ₂ О, свободную от нуклеаз	1,0	2 пробирки

Набор реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ» рассчитан на 50 определений с учетом контрольных образцов.

В основу метода положен мультилокусный анализ наличия или отсутствия фрагментов генома вибрионов, ассоциированных с эпидемической значимостью и таксономическим положением патогена методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени:

- гена **ctxA**, отвечающего за синтез А-субъединицы холерного токсина, с образованием флуоресценции по каналу **FAM**,
- гена **ctxB**, отвечающего за синтез В-субъединицы холерного токсина и несущего полиморфные нуклеотиды у типичных и генетически измененных штаммов холерных вибрионов биовара эльтор, с образованием флуоресценции по каналу **FAM**,
- генов **tcpAB**, отвечающих за синтез токсин-корегулируемых пилей адгезии, с образованием флуоресценции по каналу **JOE**,
- гена **wbeN**, входящего в кластер генов, кодирующих синтез O1 антигена холерных вибрионов, с образованием флуоресценции по каналу **FAM**,
- гена **wbfR**, входящего в кластер генов, кодирующих синтез O139 антигена холерных вибрионов, с образованием флуоресценции по каналу **JOE**,
- гена **hlyA**, отвечающего за синтез гемолизина холерных вибрионов и имеющего делецию 11 п.н. у холерных вибрионов классического биовара, с образованием флуоресценции по каналу **ROX**,
- гена **lolB**, отвечающего за синтез липопroteина внешней мембраны и являющегося специфичным для холерных вибрионов, с образованием флуоресценции по каналу **ROX**.

Эпидемические значимые штаммы холерных вибрионов содержат в составе хромосомы ctxA и tcpAB гены, тогда как эпидемически безопасные штаммы лишены этих генов. Амплификация ctxA и tcpAB генов осуществляется в одной смеси «ПЦР-смесь-эпид».

Штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы несут в составе хромосомы гены lolB и wbeN, *V. cholerae* O139 серогруппы – гены lolB и wbfR, *V. cholerae* не O1 не O139 серогруппы – только ген lolB. Амплификация данных генов осуществляется в одной смеси «ПЦР-смесь-таксон».

Биовары холерных вибрионов имеют отличия в нуклеотидной последовательности hlyA гена: у классического биовара выявлена делеция размером 11 п.н., а у эльтор биовара и *V. cholerae* не O1 серогруппы – её нет. Амплификация hlyA гена осуществляется с использованием «ПЦР-смесь-эпид». Выявление данного локуса с учетом принадлежности вибрионов к определенной серогруппе позволяет провести дифференциацию биоваров *V. cholerae*: амплификация hlyA гена у холерных вибрионов O1 серогруппы (по результатам реакции с «ПЦР-смесью-таксон»: FAM⁺JOE⁻ROX⁺) указывает на их принадлежность к *V. cholerae* биовара эльтор, тогда как отсутствие амплификации hlyA гена у холерных вибрионов O1 серогруппы (по результатам реакции с «ПЦР-смесью-таксон»: FAM⁺JOE⁻ROX⁺) указывает на их принадлежность к *V. cholerae* классического биовара,

Генетически измененные варианты холерных вибрионов биовара эльтор характеризуются более высокой вирулентностью. В качестве генетических маркеров таких штаммов могут быть использованы полиморфные нуклеотиды в гене ctxB. Так, в нуклеотидной последовательности ctxB гена в позиции 203 у типичных штаммов вибрионов эльтор находится нуклеотид «Т» (аллель ctxBeltor), а у генетически измененных – нуклеотид «С» (аллель ctxBclass). Использование аллельспецифичных праймеров, входящих в состав смесей «ПЦР-смесь-B203C» и «ПЦР-смесь-B203T», обеспечивает амплификацию данного гена с различной интенсивностью у типичных и генетически измененных вариантов холерных вибрионов эльтор.

Если $Ct_{B203C} \leq Ct_{B203T}$ в 0,8 и более раз (больше чем на 4 и более циклов) или наблюдается амплификация только с PC B203C, то исследуемый штамм *V. cholerae* биовара эльтор содержит аллель *ctxBclass* и является генетически измененным по *ctxB* гену.

Если $Ct_{B203C} \geq Ct_{B203T}$ в 1,2 и более раз (больше чем на 4 и более циклов) или наблюдается амплификация только с PC B203T, то исследуемый штамм *V. cholerae* биовара эльтор содержит аллель *ctxBeltor* и является типичным по *ctxB* гену.

Проведение анализа включает три этапа: 1. выделение ДНК из проб клинического материала, 2. амплификация с «ПЦР-смесью-эпид» и «ПЦР-смесью-таксон» на приборах типа Rotor Gene и планшетных амплификаторах типа CFX, для выявления холерных вибрионов с одновременным определением эпидемической значимости и таксономического положения, 3. в случае обнаружения в пробе ДНК эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор определение их принадлежности к генетически измененным вариантам с использованием смесей «ПЦР-смесь-B203C» и «ПЦР-смесь-B203T».

Тип используемых зондов в смесях «ПЦР-смесь-эпид» и «ПЦР-смесь-таксон» – TaqMan. Образование флуоресцентного сигнала происходит за счет освобождения флуоресцентных меток при расщеплении зонда ферментом Taq ДНК-полимеразы (5'-экзонуклеазная активность). С каждым циклом ПЦР число свободных флуоресцентных меток экспоненциально возрастает, что приводит к повышению уровня флуоресценции в пробирке. Учет результатов флуоресценции проводят по каждому каналу отдельно.

Амплификация аллельспецифичных праймеров в смесях «ПЦР-смесь-B203C» и «ПЦР-смесь-B203T» осуществляется в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green, что приводит к накоплению флуоресцентного сигнала за счет связывания красителя с образующимися ампликонами.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять ДНК *V. cholerae* в суспензии с концентрацией не менее 1×10^3 м.к./мл и идентифицировать патоген по таксономическому положению (O1 и O139 серогруппа, биовар), эпидемической значимости (*ctxA* и *tcpAB* гены) и дифференцировать генетически измененные варианты токсигенных штаммов *V. cholerae* эльтор по наличию полиморфных нуклеотидов в *ctxB* гене.

Аналитическая специфичность.

Набор не должен давать положительных результатов с ДНК микроорганизмов других родов в суспензиях с концентрацией 1×10^4 м.к./мл

Диагностическая чувствительность - не менее 98,5 % с достоверной вероятностью 90%; при анализе 278 положительных проб (152 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 54 проб клинического материала и 72 проб объектов окружающей среды), содержащих холерные вибрионы в концентрации 1×10^3 м.к./мл, получен положительный результат с верной идентификацией по принадлежности к серогруппам, биовару и эпидемической значимости - в 278 случаях; из них при анализе 74 положительных проб (48 проб бактериальных суспензий, 26 проб клинического материала, объектов окружающей среды), содержащих *V. cholerae* O1 биовара Эльтор эпидемически значимые в концентрации 1×10^3 м.к./мл, был верно определен тип *ctxB* гена в 74 случаях.

Диагностическая специфичность - не менее 99 % с достоверной вероятностью 90%; при анализе 278 положительных проб (152 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 54 проб клинического материала и 72 проб объектов окружающей среды), содержащих холерные вибрионы в концентрации 1×10^3 м.к./мл,

получен положительный результат с верной идентификацией по принадлежности к серогруппам, биовару и эпидемической значимости - в 278 случаях, при исследовании 84 отрицательных проб (70 проб чистых культур, 6 проб клинического материала и 8 проб объектов окружающей среды), содержащих гетерологичные микроорганизмы *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. damsella*, *V. furnissii*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. abortus*, *C. braakii*, *E. faecal*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *F. tularensis*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *St. pyogenes*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* в концентрации 1×10^4 м.к./мл, получен отрицательный результат в 84 случаях.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

4.1. Информация об инфекционных или микробных рисках.

Набор реагентов может быть использован в учреждениях, имеющих Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности.

Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, поэтому этапы подготовки образцов и проведение ПЦР-анализа проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» и МУ 1.3.2569 - 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.2. Информация об экологических рисках.

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.3. Информация о физических рисках, в том числе возможность взрыва или возгорания.

Набор реагентов следует применять по назначению в комбинации приборами, прошедшими надлежащее техническое обслуживание. Необходимо строгое соблюдение инструкций по эксплуатации электрооборудования, безопасности при работе с электроприборами.

4.4. Информация о рисках применения, приводящих к ошибочному результату исследования:

- Использование набора реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ» с истекшим сроком годности;
- Нарушение условий транспортирования, хранения набора реагентов;
- Нарушения упаковки и внешнего вида компонентов набора реагентов;
- Нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- Нарушение условий окружающей среды при эксплуатации набора реагентов;
- Нарушение процесса проведения анализа, регистрации и учета результатов.
- Применение по назначению МИ в комбинации со средствами измерения, не прошедшими поверку и/или калибровку.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, необходимые при работе с изделием*

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа RotorGene	Амплификатор «RotorGene 6000», «RotorGene Q», «Qiagen», Германия
Амплификатор типа CFX	Амплификатор CFX 96 «БиоРад», США
Ламинарный бокс биологической безопасности класс ПБ	Ламинарный бокс биологической безопасности класс II БАВп-«Ламинар-С-1,2», «Ламинарные системы», Россия
ПЦР-бокс	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» «Ламинарные системы», Россия
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-встряхиватель «ТЭТА-2», «Биоком», Россия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, Термо 24-15, «Биоком», Россия.
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга на 13400 об/мин "Mini Spin" "Eppendorf", Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский "ОМ-1" ОАО "Утес", Россия
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
Набор электронных или механических дозаторов переменного объема	Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (0,5-10, 10-100 мкл, 100-1000 мкл), Eppendorf, Германия
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл, 10×20 мест, «Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 5×10 мест с увеличенным расстоянием между лунками, «Хеликон», Россия
Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 18°С	«Атлант», Россия
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США

Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пипетки стеклянные	ГОСТ 29227-91
Пробирки стеклянные	ГОСТ-1770-74
Одежда одноразовая медицинская из нетканого и полимерного материалов	РЗН 2013/668
Перчатки медицинские диагностические одноразовые. Часть 1. Спецификация на перчатки из каучукового латекса или раствора	ГОСТ Р 52239-2004

* Примечание: допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследования служат:

- пробы чистых культур микроорганизмов: бактериальные суспензии культур холерных вибрионов или подозрительных изолятов, жидкие среды накопления;
- пробы клинического материала: испражнения, рвотные массы, желчь;
- пробы объектов окружающей среды: вода (питьевая, из поверхностных водоемов и др.), сточные воды, смывы с поверхностей;
- пищевые продукты.

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично закручивающимися крышками в соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036 – 95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». После проведения предварительной обработки проб допускается их транспортировка при температуре от минус 16 до минус 20 °С в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды следующего состава: сахара 0,218 моль, KH_2PO_4 0,0038 моль, K_2HPO_4 0,0072 моль; БСА 1 %. При необходимости длительного хранения и (или) транспортирования, при отсутствии низкотемпературных холодильников, используют специальную транспортную среду ESP: саркозил 1 %; ЭДТА 0,05 моль; проназа Е 1 мг/мл. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при температуре от плюс 20 до плюс 30 °С в темном месте до 10 дней.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

7.1. Подготовка исследуемых образцов

7.1.1. Подготовка проб чистых культур микроорганизмов, жидких сред накопления

Из культур холерных вибрионов или подозрительных изолятов готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-86-П (5 МЕ)), что соответствует $1,1 \times 10^9$ м.к./мл для *V. cholerae*. Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^3 м.к./мл.

Из жидкой среды накопления, в которую посеян биологический материал и пробы из объектов окружающей среды, отбирают по 1 мл из верхнего слоя в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающимися крышками, центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

7.1.2. Подготовка проб клинического материала

Фекалии

При наличии диареи фекалии в количестве 10-20 мл собирают в стерильную посуду объемом 60-100 мл стерильными ложками или автоматической пипеткой переменного объема. При отсутствии диареи материал забирают в количестве 1-2 г в стерильные емкости объемом 60-100 мл. Фекалии могут быть забраны во флакон или пробирку с 1 % пептонной водой.

Ректальные мазки забирают стерильным ватным тампоном или одноразовой стерильной ректальной петлей, предварительно смоченной стерильным 0,9 % раствором натрия хлористого, и помещают во флакон или пробирку с 1 % пептонной водой (среда накопления).

Жидкие фекалии переносят по 1-5 мл в микроцентрифужные пробирки с закручивающимися крышками. Пробирки центрифугируют при 9000 об/мин в течение 5 мин. Затем отбирают по 0,2 мл верхней бело-желтой части осадка (если отсутствует бело-желтый пограничный слой или полностью осадок, то отбор производят на границе осадка и супернатанта или со дна пробирки, соответственно) и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой. Пробирки центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

К плотным фекалиям добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого в соотношении 1:9, тщательно ресуспендируют с использованием микроцентрифуги-встряхивателя. Отбирают по 1 мл в микроцентрифужные пробирки. Дальнейшую подготовку проводят так же как при исследовании жидких испражнений. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

При исследовании испражнений и ректальных мазков, забранных во флаконы или пробирки с 1 % пептонной водой, отбирают по 1 мл из верхнего слоя пептонной воды в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой, центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Рвотные массы

Рвотные массы в количестве 10-20 мл собирают в стерильную посуду ложками или автоматической пипеткой переменного объема. Дальнейшую подготовку проводят так же как при исследовании жидких испражнений. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Желчь

Желчь берут при дуоденальном зондировании. В отдельные пробирки собирают две порции: из желчного пузыря и желчных протоков (В и С). Для исследования отбирают по 100 мкл в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

7.1.3. Подготовка проб из объектов окружающей среды

Вода (питьевая, из поверхностных водоемов и др.)

Пробы берут в объеме 500 мл в стерильную емкость с закручивающейся крышкой. Для концентрирования бактериальных клеток используют либо дробное центрифугирование, либо вакуумную фильтрацию.

Для дробного центрифугирования переносят по 35 мл из исследуемой пробы воды в 12 центрифужных пробирок объемом 50 мл с винтовой горловинной крышкой типа Falcon и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Удаляют надосадочную жидкость, осадок в каждой пробирке ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Из центрифужных пробирок переносят полученную суспензию в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Для исследования отбирают по 100 мкл в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Для вакуумной фильтрации используют стерильные фильтры с размером пор 0,45 мкм. В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр. После окончания фильтрации мембранные фильтры помещают обожженным анатомическим пинцетом в стерильный пластиковый пакет объемом 100 мл и вносят 10 мл 0,9 % раствора натрия хлористого. Фильтр внутри пакета растирают вручную в течение 1 мин. Полученную суспензию (смыв с фильтра) переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1,0 мл в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Сточные воды

Хозяйственно-бытовые сточные воды отбирают в объеме 0,5 л в отдельную емкость. Подготовку проб осуществляют в соответствии с п. 9.3.1. Возможен отбор проб хозяйственно-бытовых сточных вод с помощью тампонов. Марлевые тампоны, приготовленные из марлевых салфеток размером 10×10 см и сложенные в 10-15 слоев, закрепляют у места забора воды, и через сутки переносят в стерильную емкость с завинчивающейся крышкой. В лаборатории тампоны помещают в широкогорлые емкости со 1 % пептонной водой. После инкубации в среде накопления в течение 3-4 ч при температуре 37 °С отбирают по 1 мл из верхнего слоя пептонной воды в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Смывы с поверхностей

Смывы с различных объектов окружающей среды берут ватным или марлевым тампоном, смоченным 0,9 % раствором натрия хлористого, с поверхности площадью 10×10 см. Тампон опускают во флакон или пробирку с 1 % пептонной водой. После инкубации в среде накопления в течение 3-4 ч при температуре 37 °С отбирают 1 мл из верхнего слоя пептонной воды в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

7.1.4. Подготовка проб пищевых продуктов

Пищевые продукты отбирают по 200 г плотных и 0,5 л жидких, помещают в емкости с завинчивающимися крышками. Дальнейшую подготовку жидких пищевых продуктов проводят в соответствии с п.6.5. Из твердых продуктов берут навеску 25 г, добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость отбирают по 1 мл в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и

центрифугируют в течение 2-3 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в отдельные микропробирки и центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Обеззараживание материала:

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с МУ 1.3.2569 - 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Дополнительно к исследуемым образцам готовят отрицательный контроль выделения (ОКВ). Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ТЕ-буфера.

К исследуемым образцам и ОКВ добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01%) с последующим прогреванием их при $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Затем к 100 мкл образцов, обработанных мертиолятом натрия и разлитых в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий буфер на основе 6 моль гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубируют 15 минут при температуре $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

7.2. Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб В», «Рибо-преп» или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанному набору.

7.3. Проведение ПЦР – амплификация ДНК

Важно !!! На первом этапе проводят амплификацию с ПЦР-смесью-эпид и «ПЦР-смесью-таксон». Затем в случае обнаружения в пробе ДНК эпидемически опасных штаммов холерных вибрионов биовара эльтор определяют их принадлежность к генетически измененным вариантам с использованием смесей «ПЦР-смесь-B203С» и «ПЦР-смесь-B203Т».

7.3.1. Подготовка ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ, ПКО ДНК *ctxB eltor*, ПКО ДНК *ctxB class*

Перед началом работы готовят ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ, ПКО ДНК *ctxB eltor*, ПКО ДНК *ctxB class*. Для этого в соответствующие пробирку с сухим ПКО добавляют 100 мкл растворителя, выдерживают при комнатной температуре в течение 20-30 с, тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5-7 с и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки. После растворения ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ, ПКО ДНК *ctxB eltor*, ПКО ДНК *ctxB class* хранят при температуре минус 20°C в течение срока годности набора.

7.3.2. Подготовка реакционных пробирок со смесями РС-эпид и РС-таксон

Из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь-эпид и ПЦР-смесь-таксон, ПЦР-смесь-РГФ, ТЕ-буфер, из морозильной камеры извлекают Taq ДНК-полимеразу и ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ. Пробирку с ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ полностью оттаивают, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки.

Определяют количество реакций в эксперименте из расчета: количество исследуемых проб, ОКВ, положительный контроль (К+) и отрицательный контроль (К-). Для проведения реакции в штатив отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл для РС-эпид и РС-таксон. Пробирки маркируют.

Важно!!! Если исследование выполняется с использованием амплификаторов CFX пробирки маркируют сбоку, так как учет флуоресценции на данном приборе осуществляется сверху.

В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционные смеси РС-эпид и РС-таксон из расчета, что на 1 реакцию необходимо:

Реакционная смесь	Реагент	Объем, мкл
РС-эпид	ПЦР-смесь-эпид	5
	ПЦР-смесь-РГФ	10
	Тaq ДНК-полимераза	0,4
РС-таксон	ПЦР-смесь-таксон	5
	ПЦР-смесь-РГФ	10
	Тaq ДНК-полимераза	0,4

Подготовленные смеси тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и вносят по 15 мкл подготовленных реакционных смесей в соответствующие микропробирки.

Затем в пробирки с РС-эпид и РС-таксон вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и ОКВ. В микропробирки с отрицательными контролями амплификации (К_{эпид}⁻ и К_{таксон}⁻) вносят по 10 мкл ТЕ-буфера, в микропробирки с положительными контролями амплификации (К_{эпид}⁺ и К_{таксон}⁺) – по 10 мкл ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ.

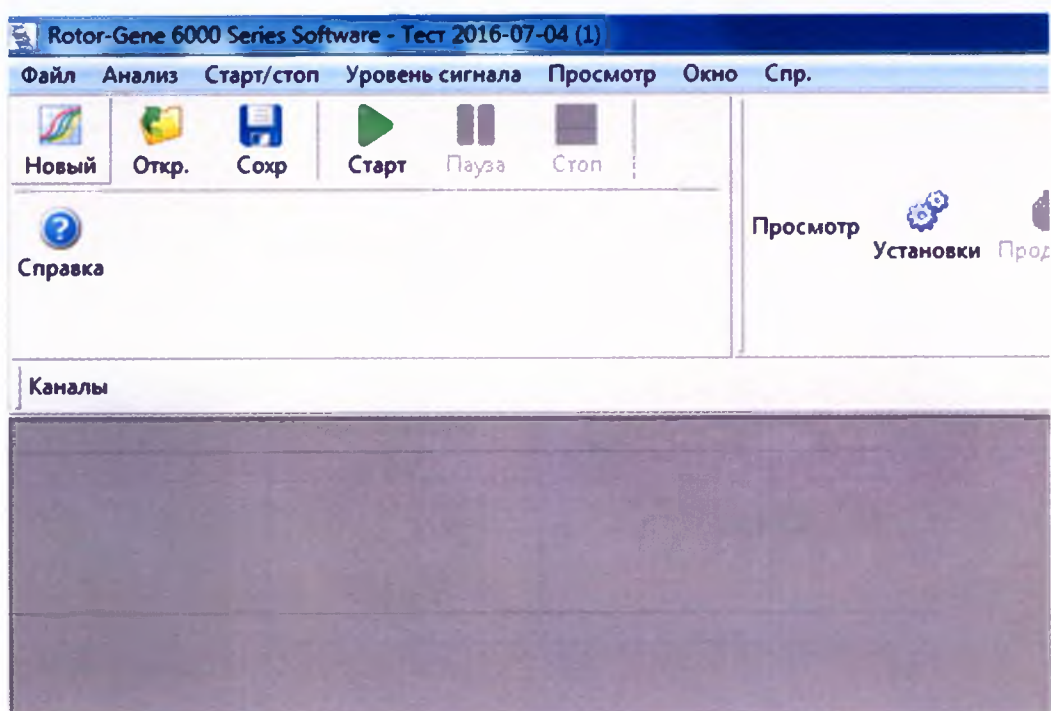
7.3.3. Проведение термоциклирования со смесями РС-эпид и РС-таксон

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа RotorGene или CFX.

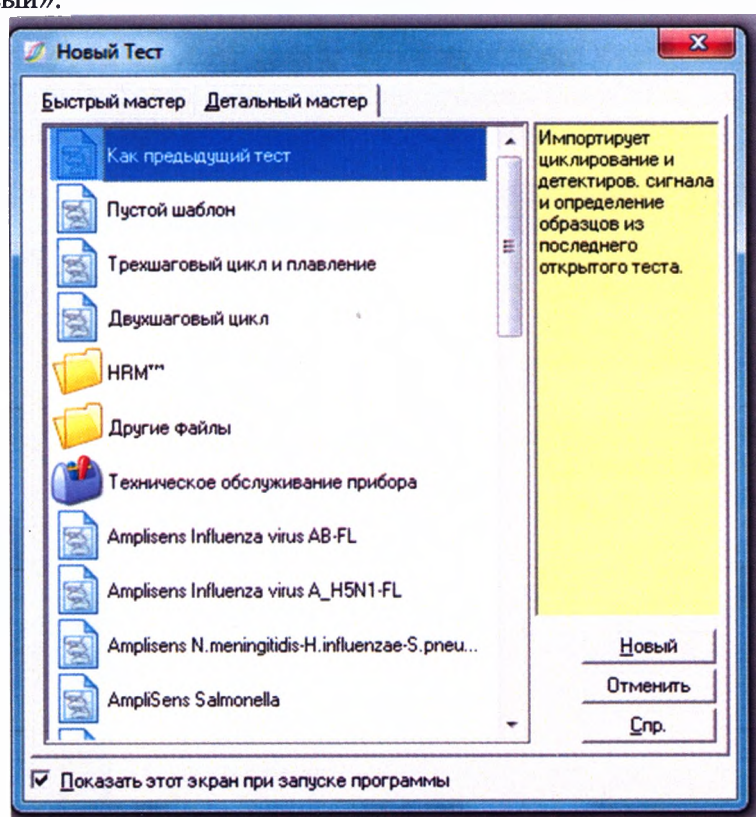
Программирование амплификатора типа RotorGene:

Для работы с прибором прибором «Rotor-Gene» 6000 и «RotorGene» Q- программу “Rotor-Gene 6000” версии 1.7 (build 67) или выше. При описании программы термины для каждой версии программы представлены следующим образом: для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажимают кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.

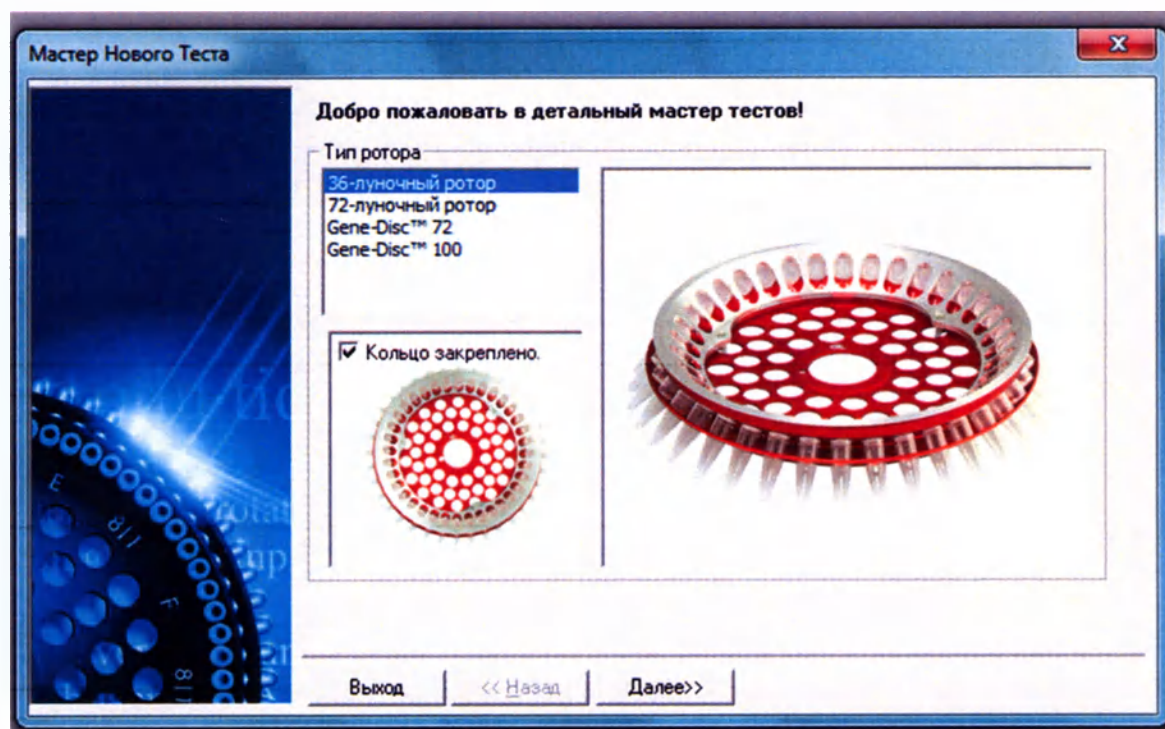


2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер» Нажимают кнопку «New»/«Новый».

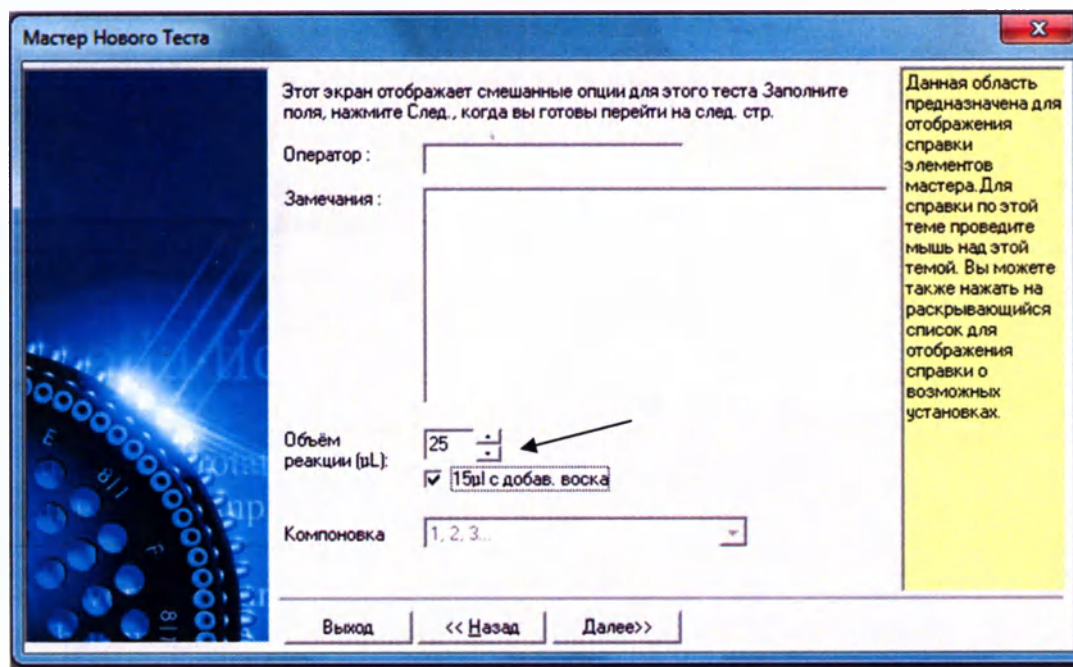


3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».

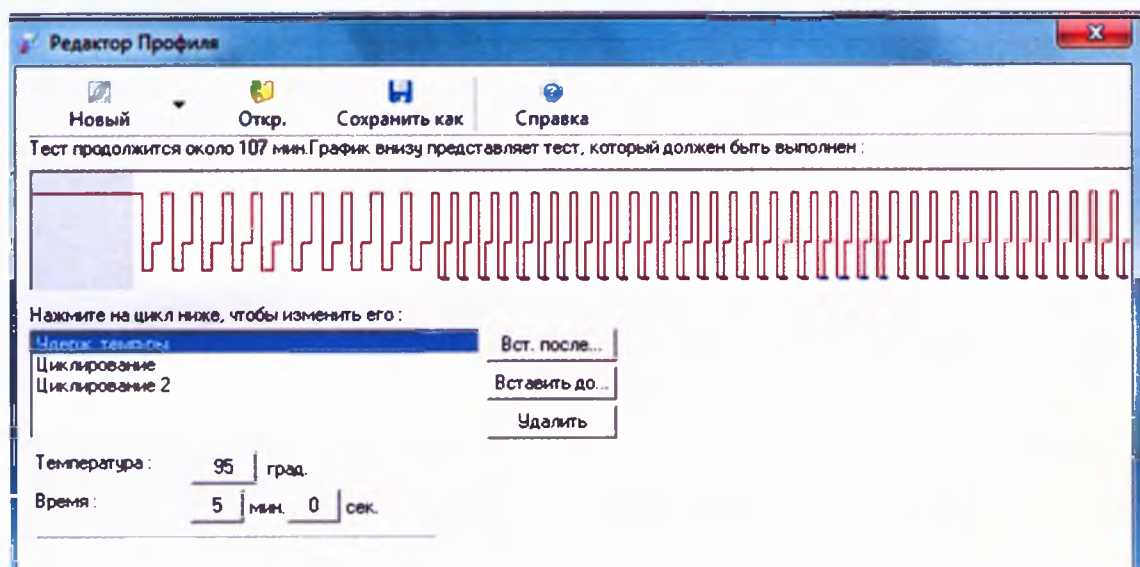
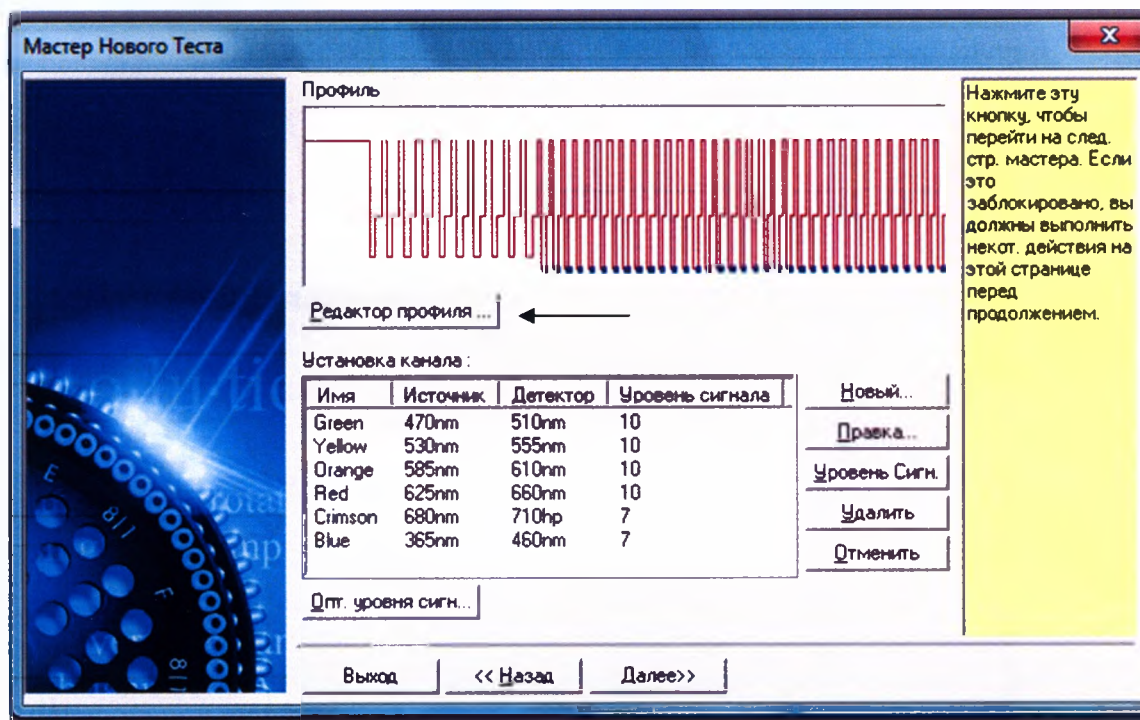
4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



5. Выбирают объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



6. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».



8. Задают следующие параметры эксперимента:

Hold/Удерж. температуры 95 °C - 5 мин

Cycling/Циклирование 95 °C - 30 с

60 °C - 30 с

72 °C - 30 с

Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.

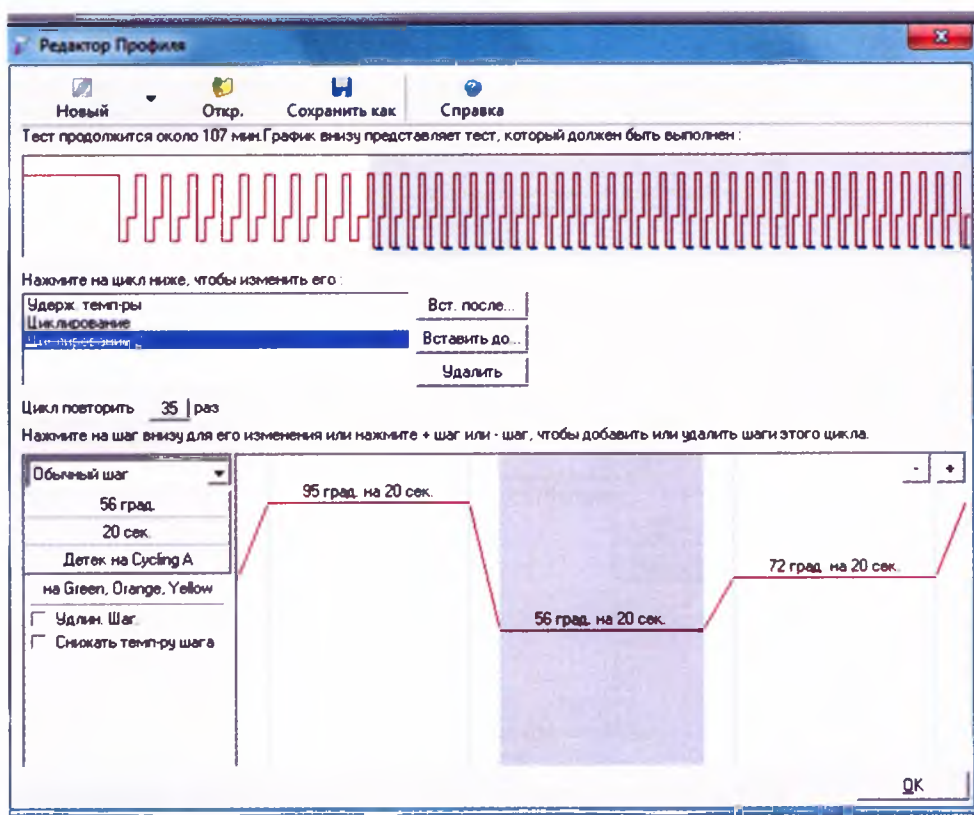
Cycling2/Циклирование2 95 °C - 20 с

56°C - 20 с - Детекция

72 °C - 20 с

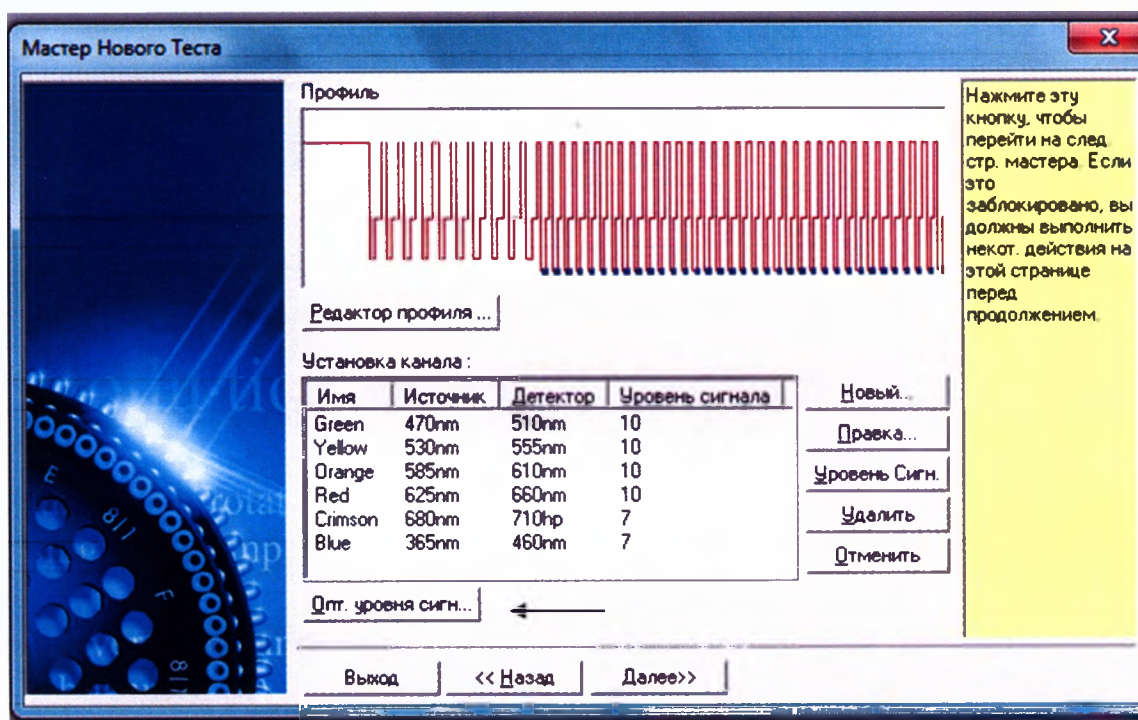
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.

Флуоресценцию измеряют при 56 °C (во втором блоке циклирования) по каналу FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange.

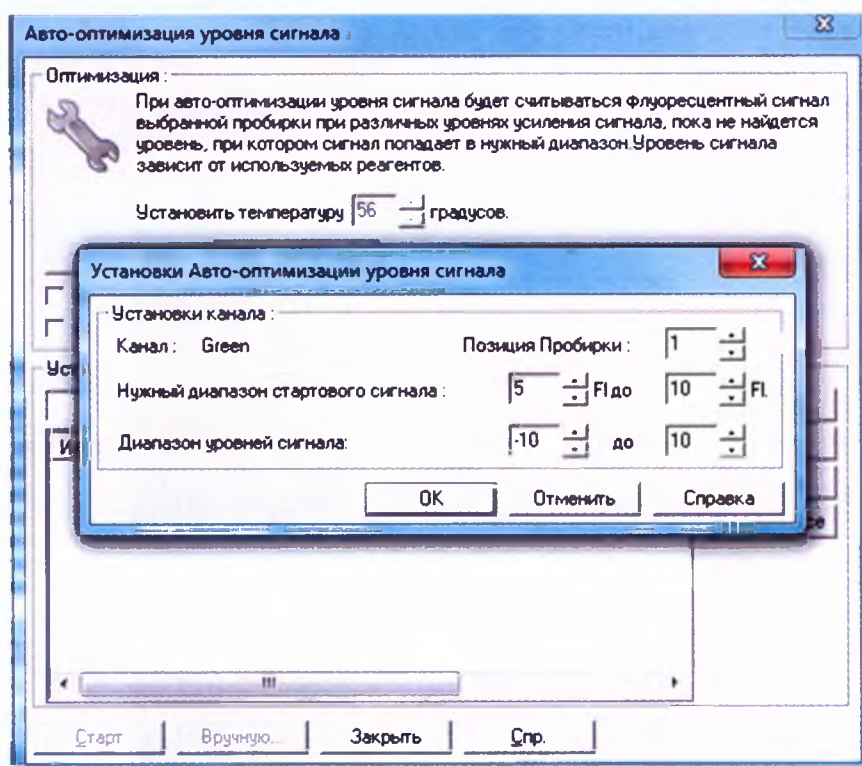
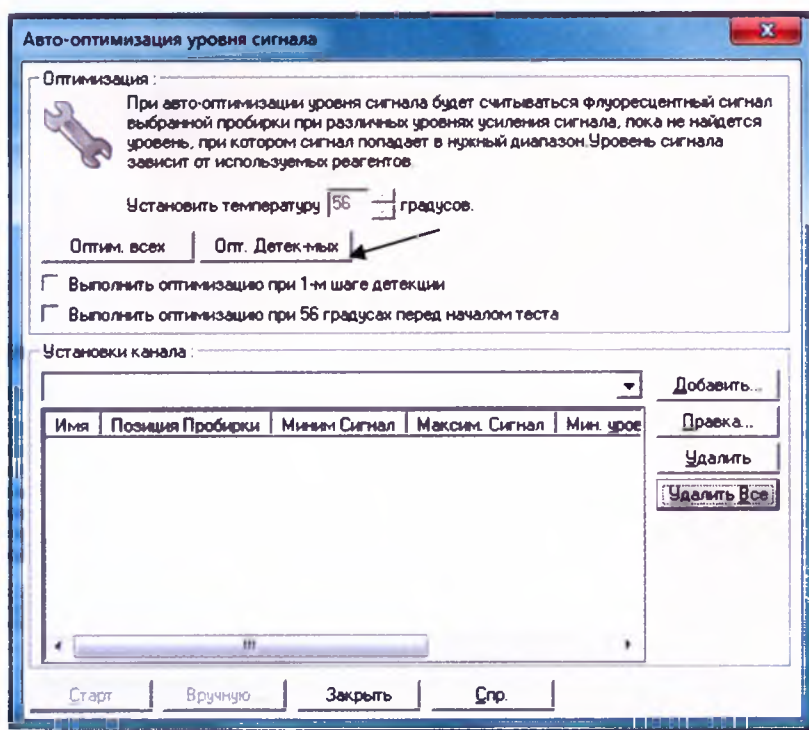


Нажимают кнопку «ОК»/«Да».

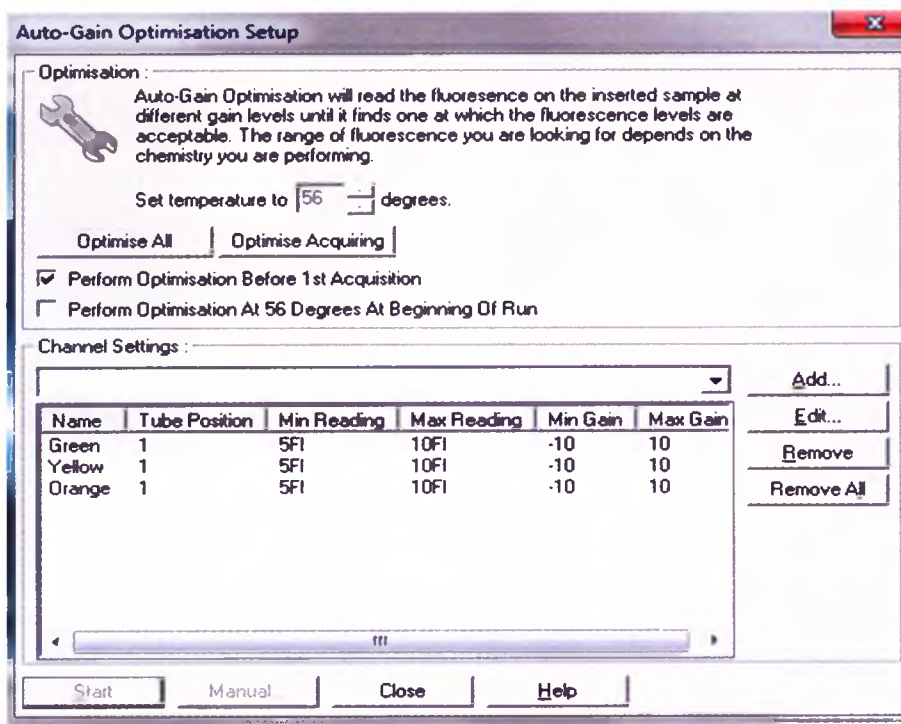
9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.».



В открывшемся окне нажимают кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых».



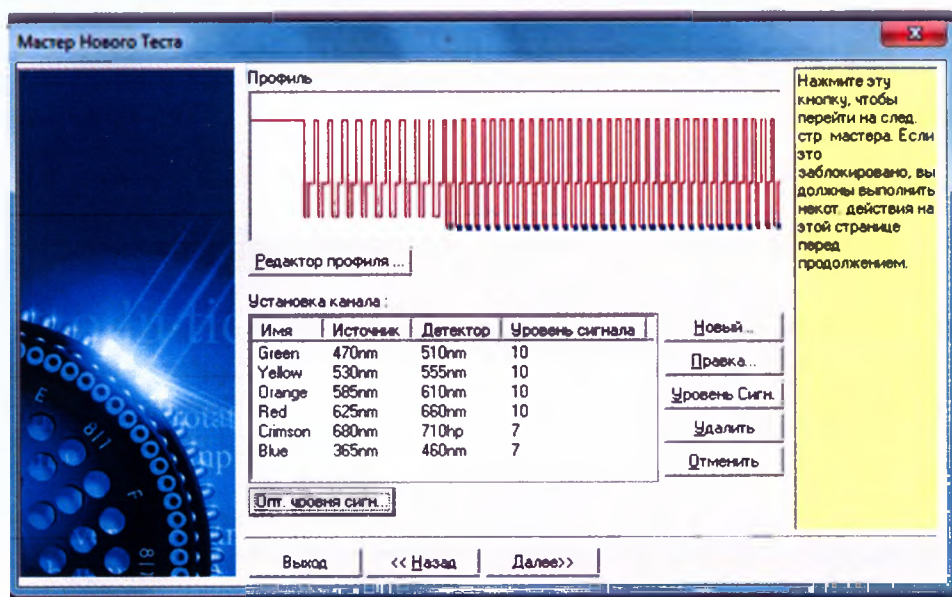
- для красителя **FAM/Green** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10**,
- для красителя **JOE/Yellow** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10**,
- для красителя **ROX/Orange** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10**.



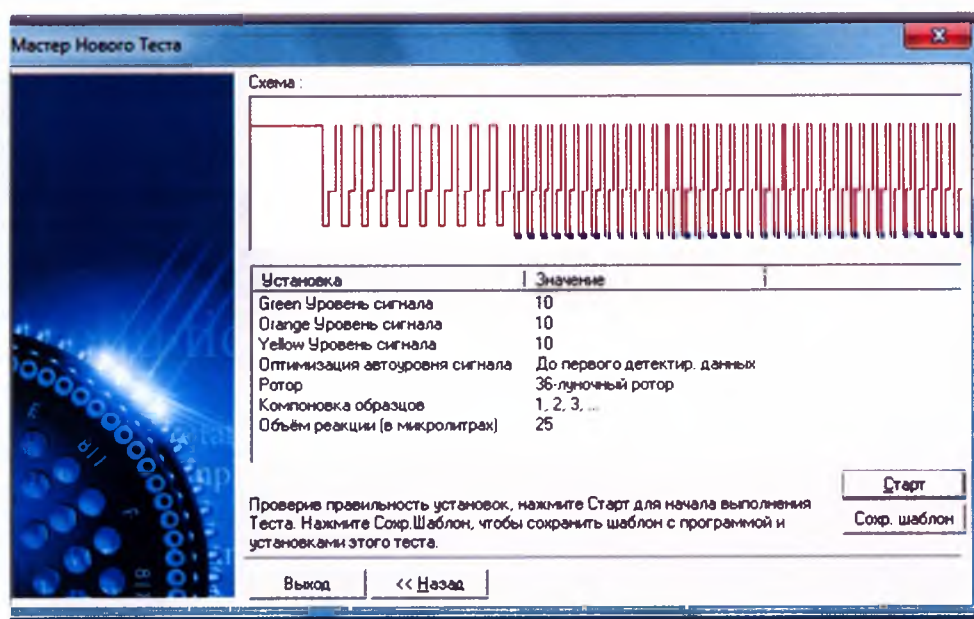
В графе *Tube position/Позиция Пробирки* указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью РС-эпид.

Помечают галочкой бокс в строке «*Perform Calibration Before 1st Acquisition*»/«*Perform Optimisation Before 1st Acquisition*»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывают окно *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала*, нажимают кнопку «Close»/«Закреть».

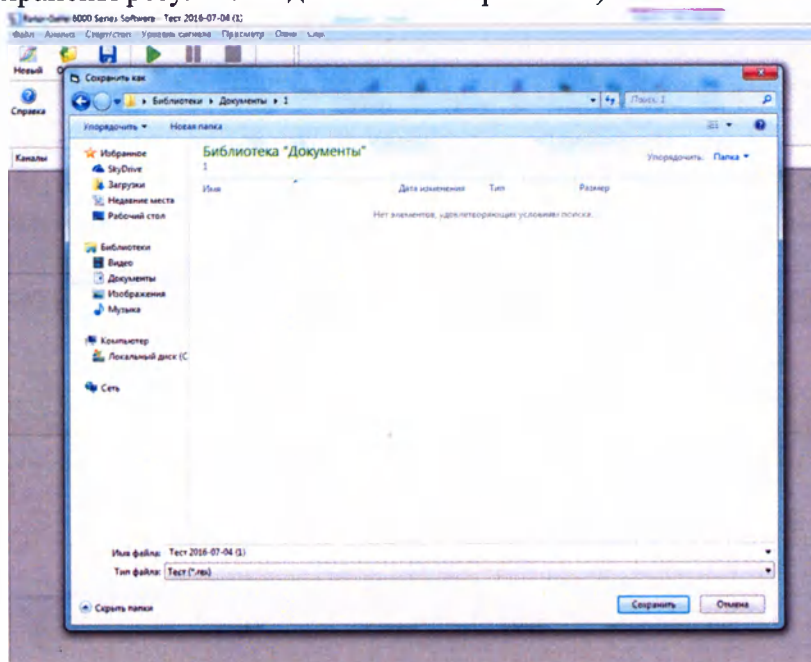
Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт». При необходимости введенные значения термоциклирования могут быть сохранены в качестве шаблона, используя кнопку «Save template/ «Сохр. шаблон».



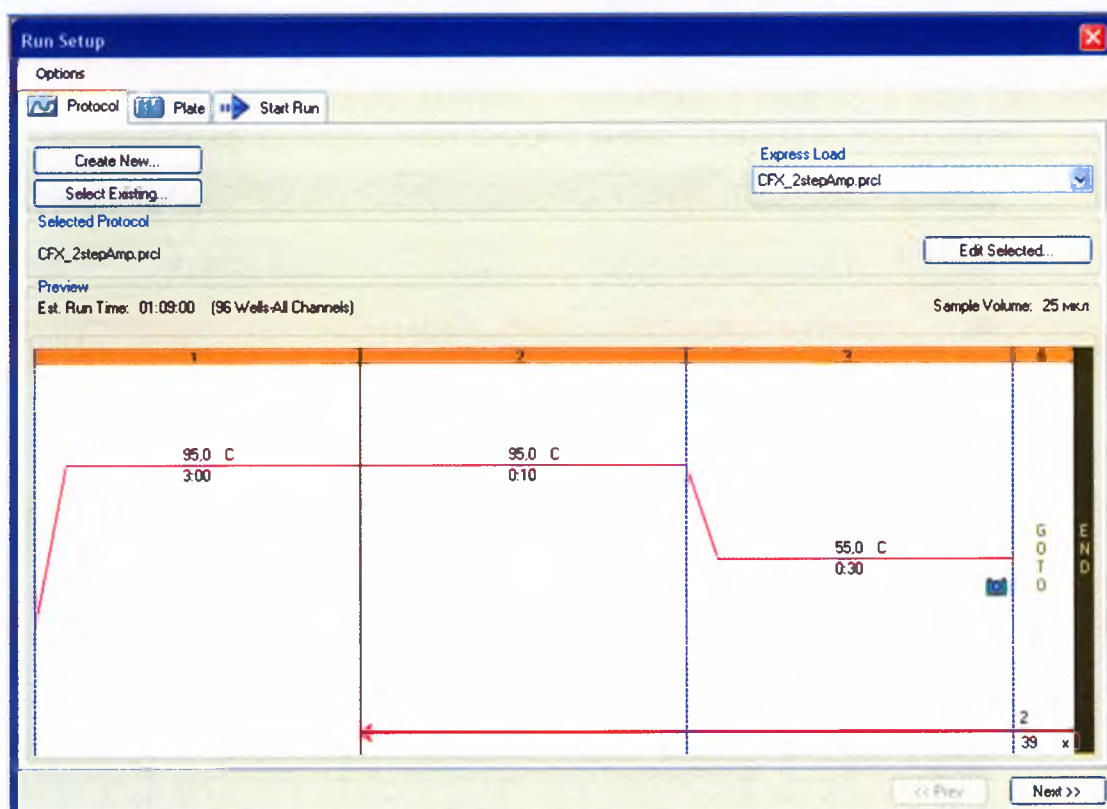
11. Дают название эксперименту и сохраняют его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).



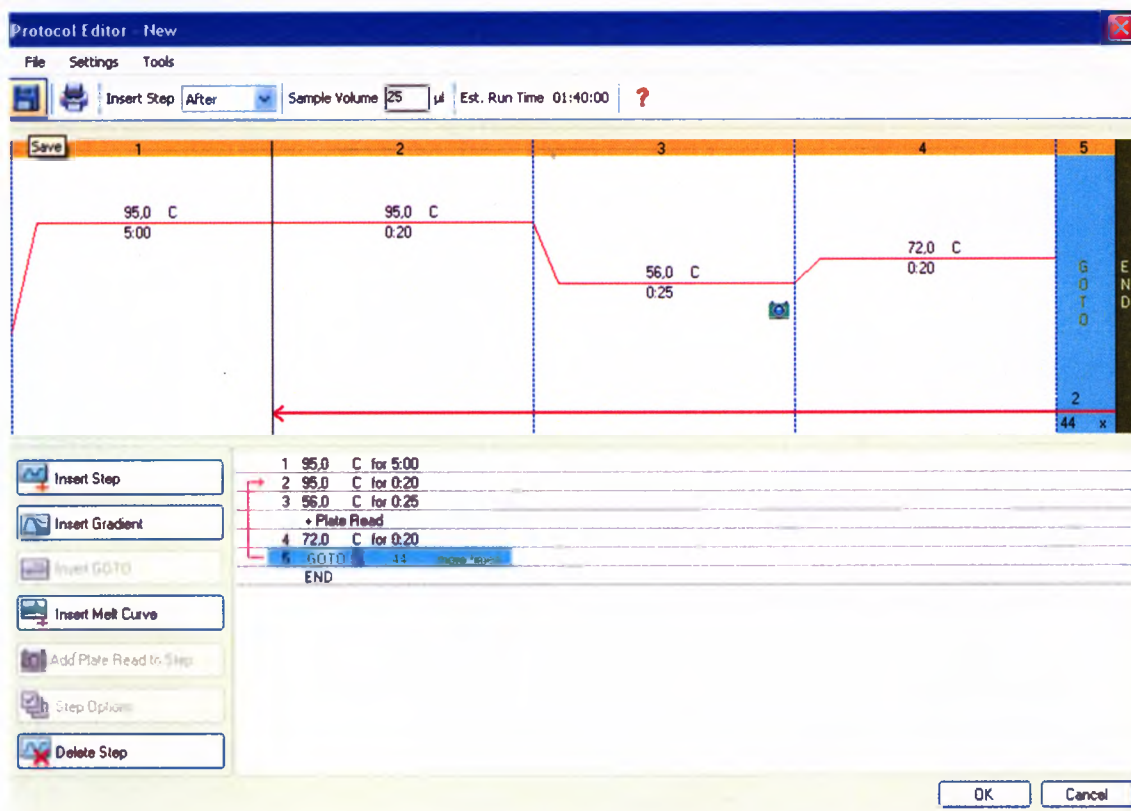
В процессе работы амплификатора или по окончании его работы программируют положение пробирок в карусели. Для этого используют кнопку «Edit samples»/«Правка образцов» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначают меню Samples/Образцы как Unknown/Неизвестный.

Программирование амплификатора типа CFX

1. Включают прибор и ждут окончания автоматической калибровки прибора.
2. Запускают программу «CFX Manager».
3. Выбирают новый эксперимент «Create a New Run».
4. Задают программу амплификации (активно окно «Protocol»), используя либо уже готовый шаблон – кнопка «Select Existing», либо создают новый – кнопка «Creative New».

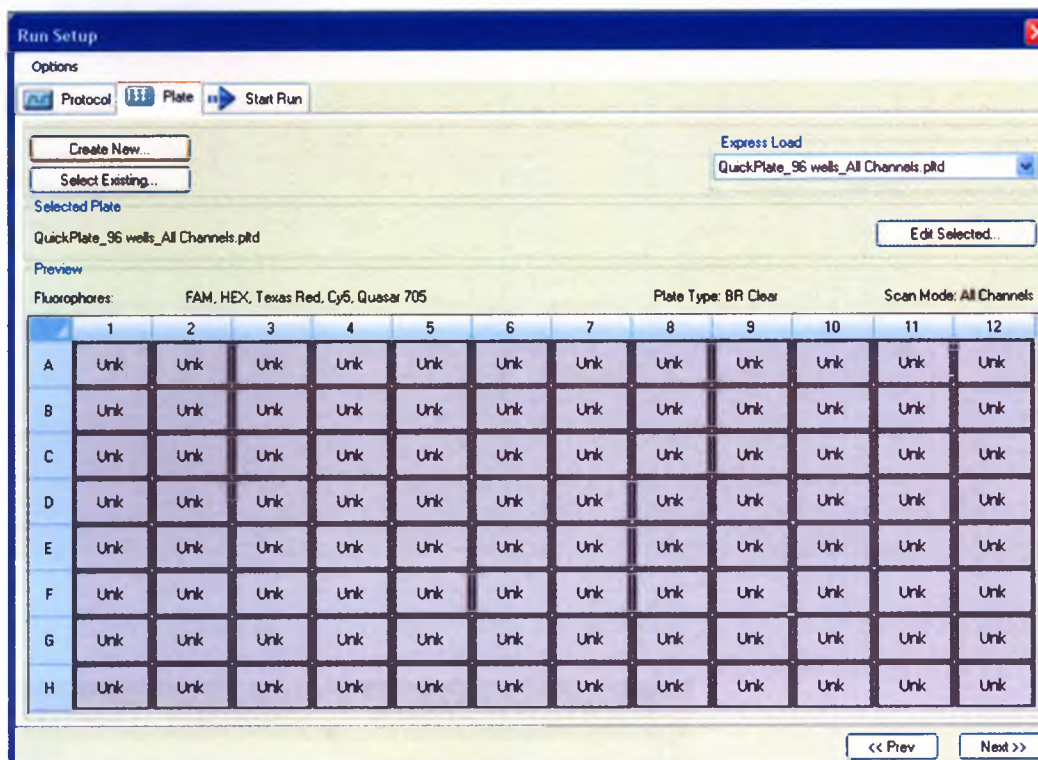


5. В случае создания нового шаблона вводят значения температуры и времени каждого шага, исходя из следующего: предварительная денатурация при 95 °C – 5 мин, 95 °C – 20 с, 56 °C – 25 с, вставка функция «Add Plate Read to Step», 72 °C – 20 с, вставка функции «GOTO» 2 – 44 цикла. После окончания ввода данных нажимают кнопку «ОК».

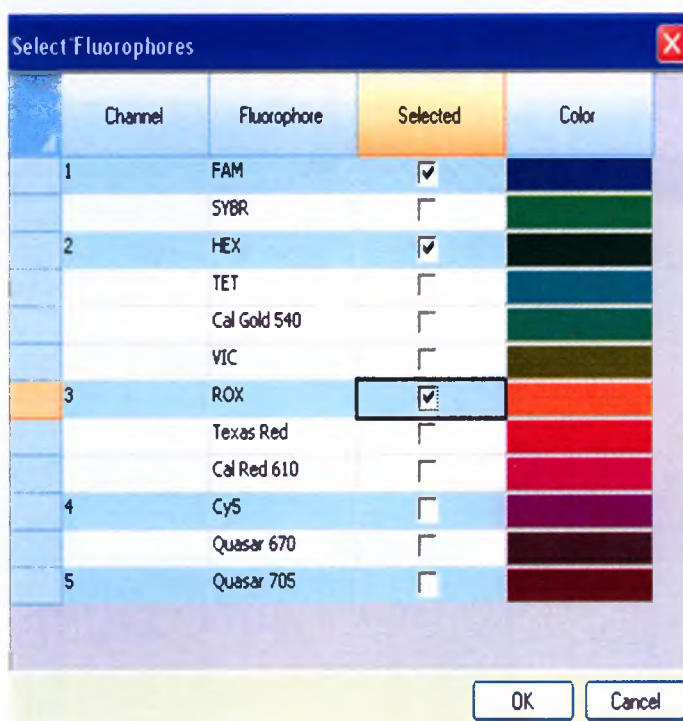
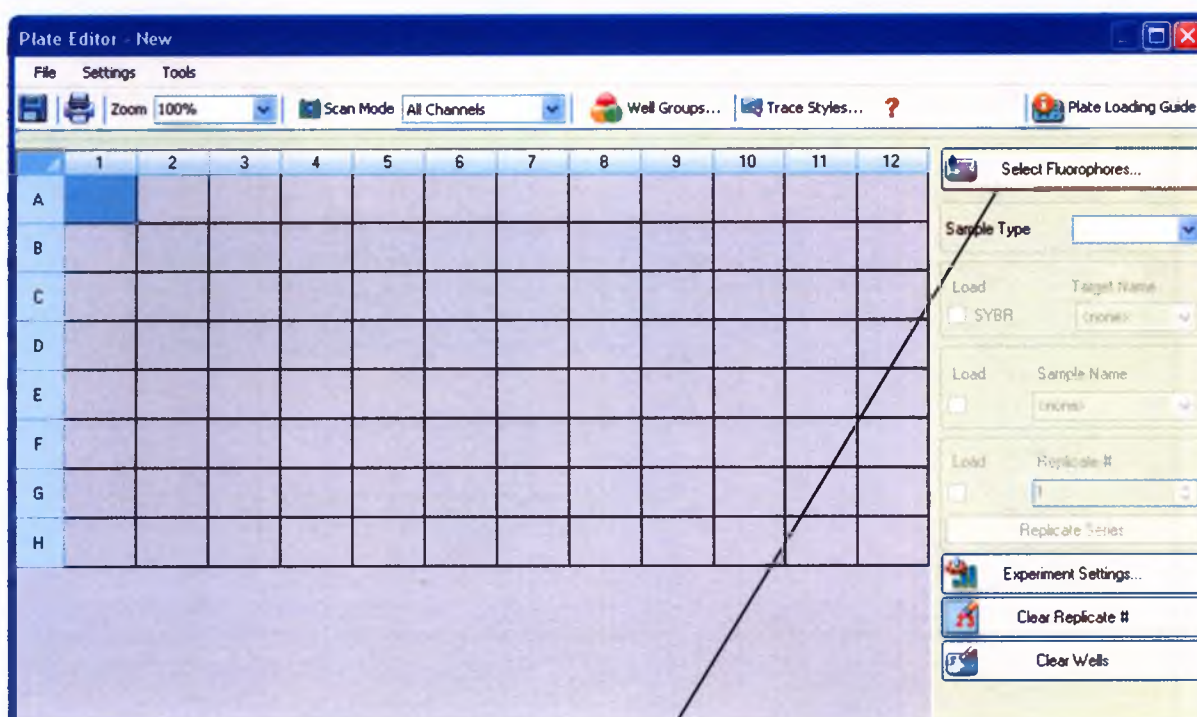


Для последующих исследований шаблон может быть сохранен путем нажатия кнопки «Save».

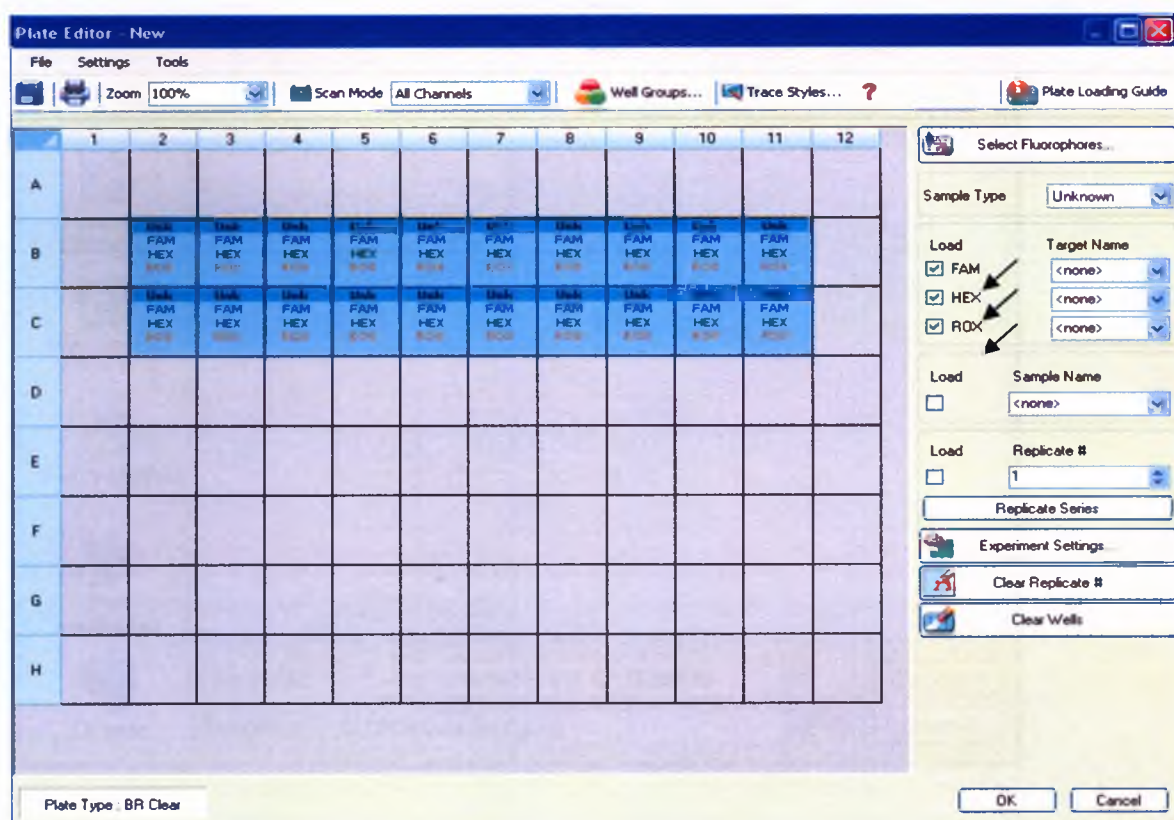
6. Задают условия эксперимента (активно окно «Plate»), используя либо уже готовый шаблон – кнопка «Select Existing», либо создают новый – кнопка «Creative New»



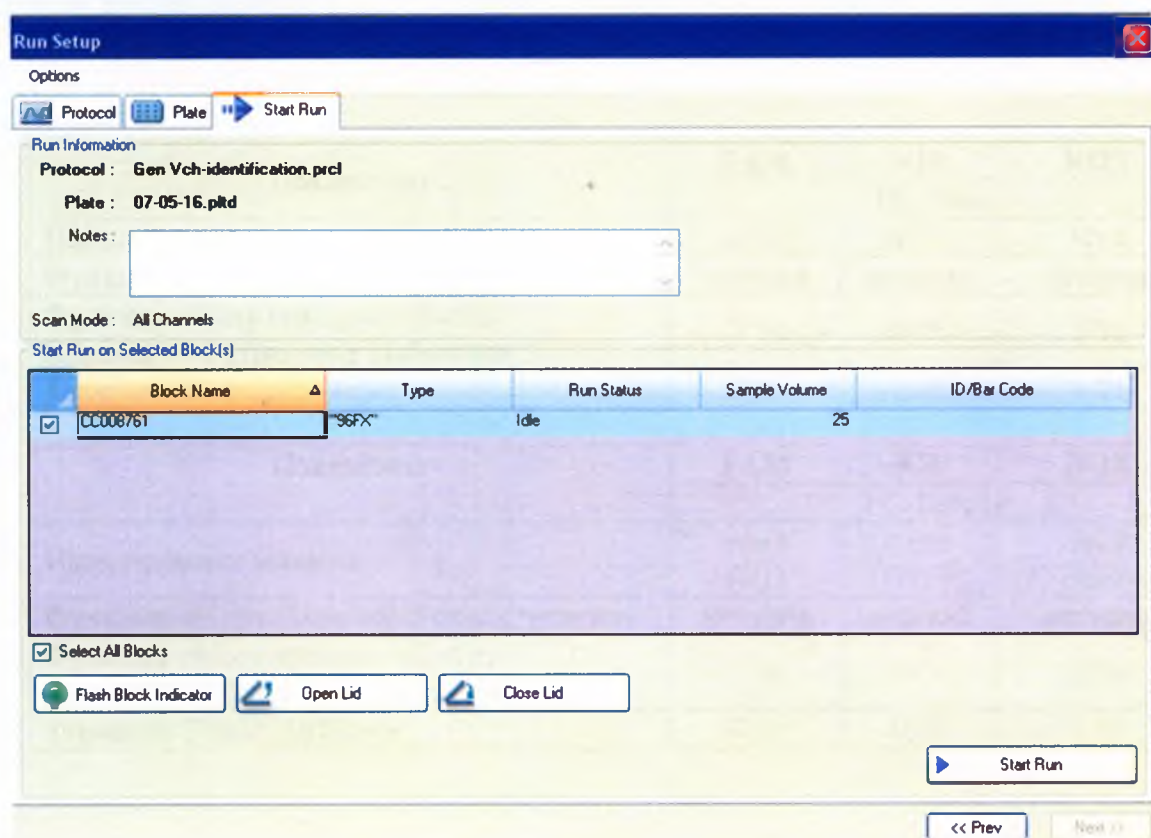
7. В случае создания новой плашки выбирают флуорофоры FAM, HEX, ROX по которым будет проводится регистрация флуоресценции, нажимая кнопку «Select Fluorophores».

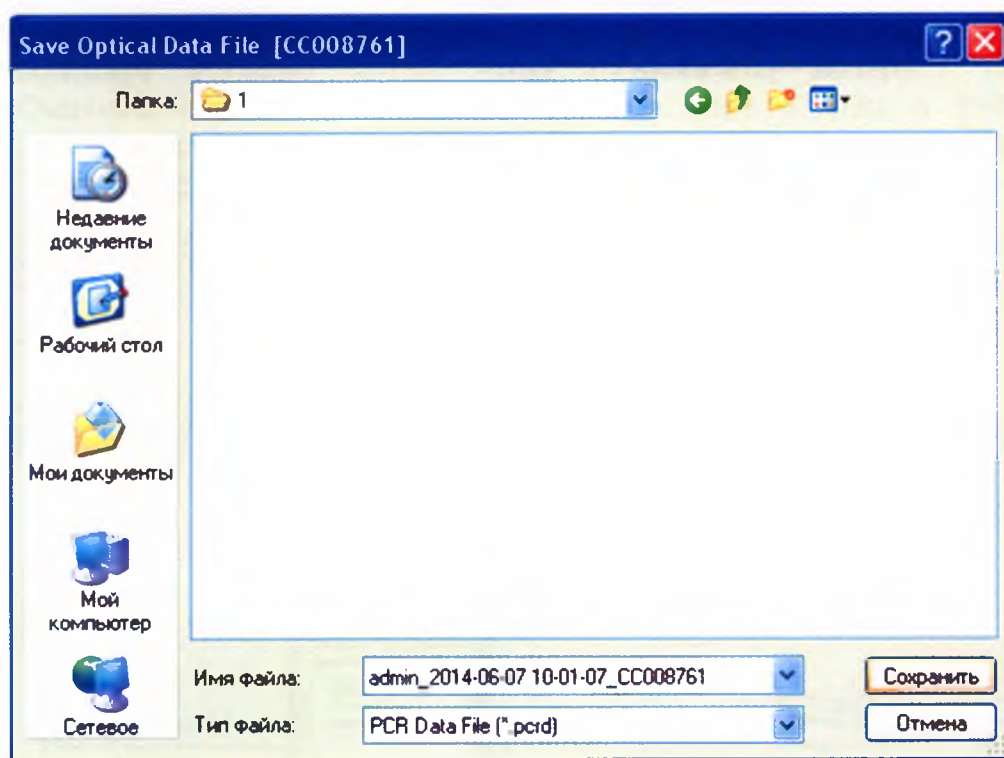


8. Затем с помощью левой кнопки мыши выделяют ячейки в которые установлены пробирки (при выделении ячейки окрашиваются в темно-серый цвет). Указывают тип образцов, для чего нажимают кнопку «Sample Type» и выбирают «Unknown». Нажимают галочки в окнах рядом с обозначенными флуорофорами. Нажимают кнопку «OK» и сохраняют файл с условиями эксперимента.



9. Запускают амплификацию (активно окно «Start Run») нажимаю кнопку «Start Run» и сохраняют в соответствующей папке протокол.





7.3.4. Регистрация и учет результатов со смесями РС-эпид и РС-таксон на приборах типа RotorGene

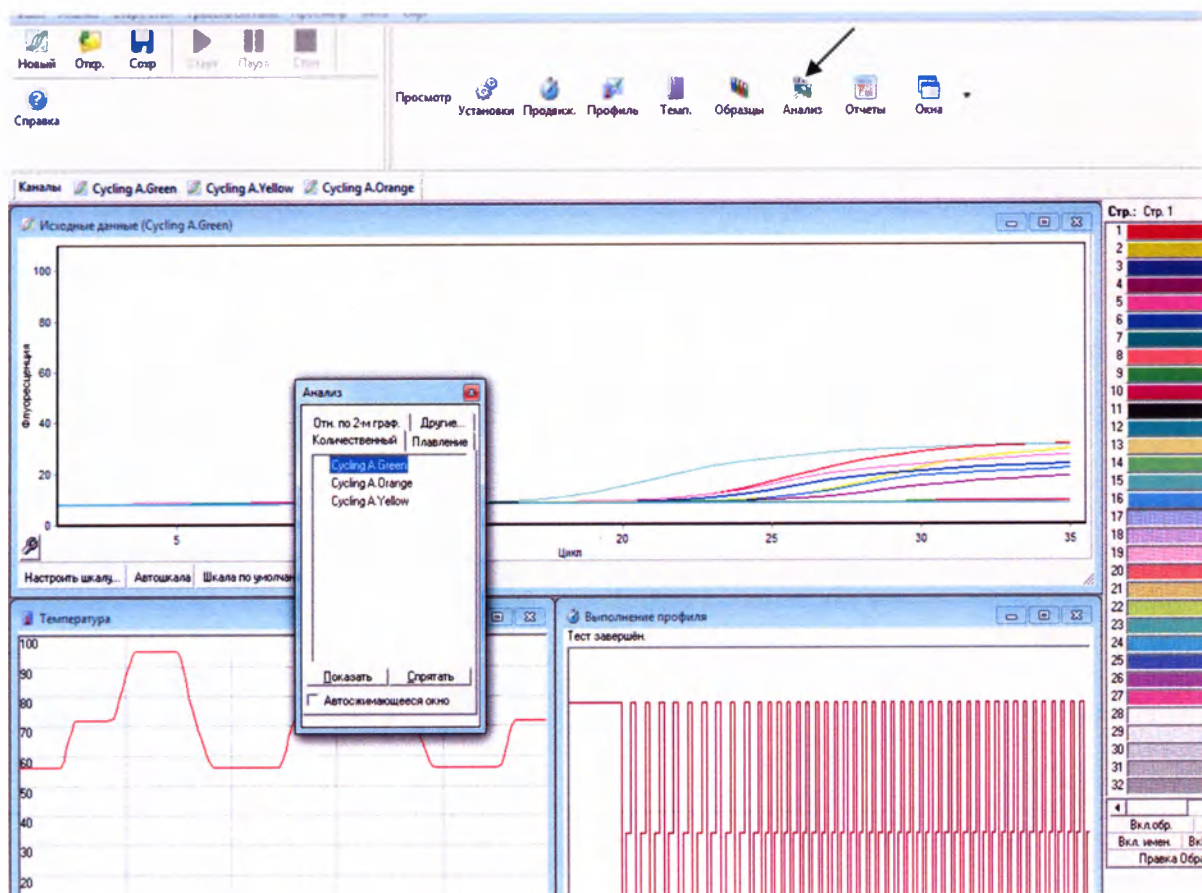
Учет данных по каналам для ПЦР-смеси-эпид и ПЦР-смеси-таксон проводят единообразно. Для регистрации результатов амплификации на приборах типа Rotor Gene используют следующие показатели.

Показатели	FAM	JOE	ROX
	РС-Эпид		
Наименование мишени	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	<i>hlyA</i>
Функция «Slope Correct»/«Коррек. уклона»	активна	активна	активна
Функция «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов»	5 %	10 %	5 %
Значения Threshold/Порог	0,05	0,05	0,05

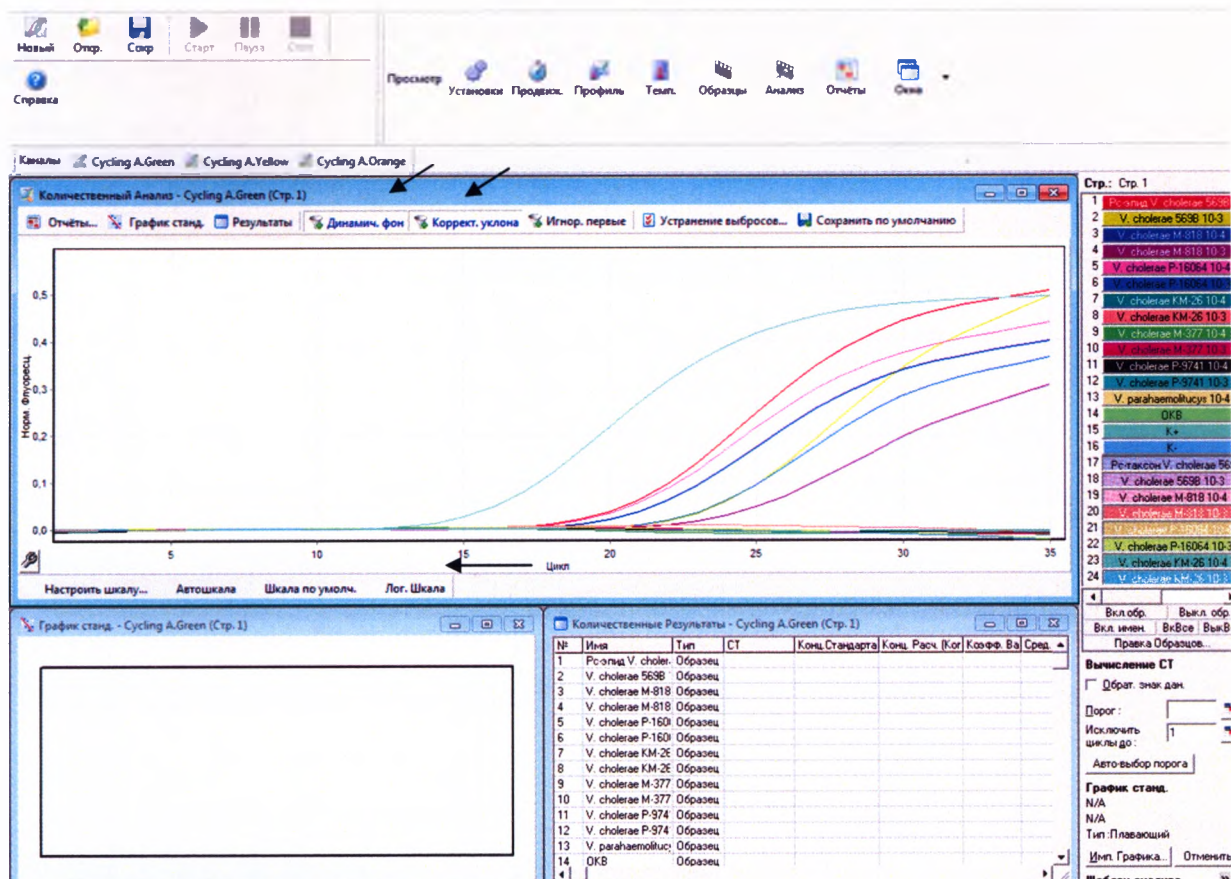
Показатели	FAM	JOE	ROX
	РС-Таксон		
Наименование мишени	<i>wbeN</i> (O1)	<i>wbfR</i> (O139)	<i>lolB</i> (<i>V. cholerae</i>)
Функция «Slope Correct»/«Коррек. уклона»	активна	активна	активна
Функция «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов»	5 %	10 %	5 %
Значения Threshold/Порог	0,05	0,05	0,05

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green (RG):

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», нажимают кнопку «Show»/«Показать». Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.



2. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
3. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).
4. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 5 %.



☒ Устранение выбросов

Порог Фона - ПФ (NTC):

Процент от наибольшего изменения флуоресценции:

0% 15% 30%

5 % Образцы с изменением флуоресценции менее этого порога (относительно наибольшего изменения в любом из образцов), будут обозначены как отрицательные - ОТР(ПФ).

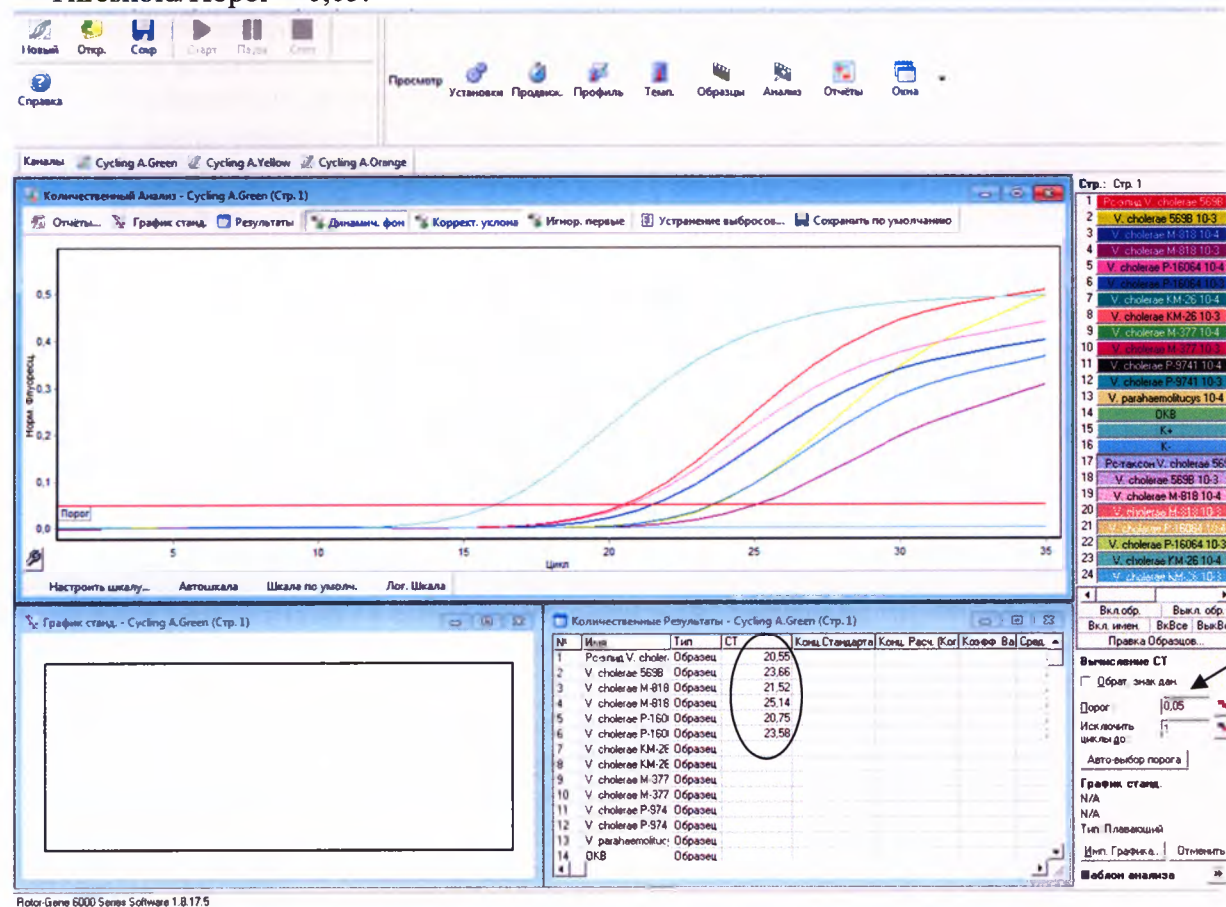
Порог Эффективности Реакции:

☐ активировать Только образцы которые имеют индивидуальную Эффективность реакции по крайней мере равную этому значению будут показаны после нормализации.

Порог: 100 %

OK Отменить Спр.

- В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.



- В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (RG):

- Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
- Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
- В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
- Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).
- В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.
- В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.
- В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange (RG):

14. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. ROX»/«Cycling A. Orange», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
15. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
16. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
17. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).
18. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 5 %.
19. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.
20. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Учет результатов со смесями PC-эпид и PC-таксон на приборах типа RotorGene

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительного, отрицательного контролей и отрицательного контроля выделения и таблицей интерпретации данных анализа с использованием PC – эпид и PC-таксон на приборах типа RotorGene.

К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительного (K+), отрицательного (K-) контролей амплификации и ОКВ.

Контроли	Значения порогового цикла (Ct) по каналу					
	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange
	PC-эпид			PC-таксон		
K+	≤ 26	≤ 26	≤ 26	≤ 26	≤ 25	≤ 25
K-	—	—	—	—	—	—
ОКВ	—	—	—	—	—	—

Для приборов типа RotorGene пороговое значение Ct для положительных проб с PC-эпид по каналам FAM, JOE, ROX составляет не более 26, пороговое значение Ct для положительных проб с PC-таксон по каналам FAM составляет не более 26, по каналам JOE и ROX – не более 25.

Если хотя бы по одному из каналов FAM, JOE, ROX с PC-эпид и PC-таксон или сразу по нескольким выявлено значение Ct в пределах более 26 но менее 30 результат анализа считают невалидным, поскольку в пробе находится недостаточное количество ДНК холерных вибрионов для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование. Если при повторном исследовании получены значение (Ct) с PC-эпид по каналам FAM, JOE, ROX составляет не более 26 и значение (Ct) с PC-таксон по каналам FAM составляет не более 26, по каналам JOE и ROX – не более 25, то результат считают положительным.

При повторном получении значений Ct в пределах более 26 но менее 30 хотя бы по одному из каналов в случае исследования нативных проб осуществляют их исследование после первичного или вторичного обогащения в жидкой питательной среде, или проводят

концентрирование клеток вибрионов в исследуемом материале путем центрифугирования или фильтрации. Анализ осуществляют с этапа выделения ДНК. При отсутствии повышения значений Ct результат считают отрицательным.

Таблица интерпретации данных анализа с использованием РС –эпид и РС-таксон на приборах типа RotorGene

Пробы	Значения порогового цикла (Ct) по каналу						Результат анализа
	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange	
	ctxA	tcpAB	hlyA	wbeN O1	wbfR O139	tolB	
	PC-эпид			PC-таксон			
Исследуемые пробы	< 26	< 26	—	<26	—	< 25	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> O1 классического биовара (ctxA+ tcpA+)
	< 26	< 26	< 26	<26	—	< 25	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор (ctxA+ tcpA+). Требуется продолжение исследований с ПЦР-смесями B203C и B203T
	< 26	< 26	< 26	—	< 25	< 25	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> O139 (ctxA+ tcpA+)
	—	—	< 26	<26	—	< 25	В пробе выявлена ДНК эпидемически безопасных штаммов <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор (ctxA- tcpA-).
	—	—	< 26	—	< 25	< 25	В пробе выявлена ДНК эпидемически безопасных штаммов <i>V. cholerae</i> O139 (ctxA- tcpA-).
	—	< 26	< 26	<26	—	< 25	В пробе выявлена ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор (ctxA- tcpA+). Эпидемическая значимость требует уточнения.
	< 26	< 26	< 26	—	—	< 25	В пробе выявлена ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> не-O1 не-O139 (ctxA+ tcpA+). Могут вызвать спорадические случаи заболевания.
	—	—	< 26	—	—	< 25	В пробе выявлена ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> не-O1 не-O139 (ctxA- tcpA-). Могут вызвать спорадические случаи заболевания.
	При значении Ct по одному или нескольким каналам						Результат невалидный.
	>26 – <30	>26 – <30	>26 – <30	>26 – <30	>25 – <30	>25 – <30	В пробе выявлена ДНК холерных вибрионов в количестве недостаточном для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование, в том числе с использованием проб после первичного или вторичного обогащения в жидкой питательной среде, или провести концентрирование клеток вибрионов в пробе.
—	—	— или < 25	—	—	—	В пробе ДНК холерных вибрионов не обнаружена	

Пример учета и интерпретации результатов анализа на приборе типа Rotor Gene представлены в приложении 1.

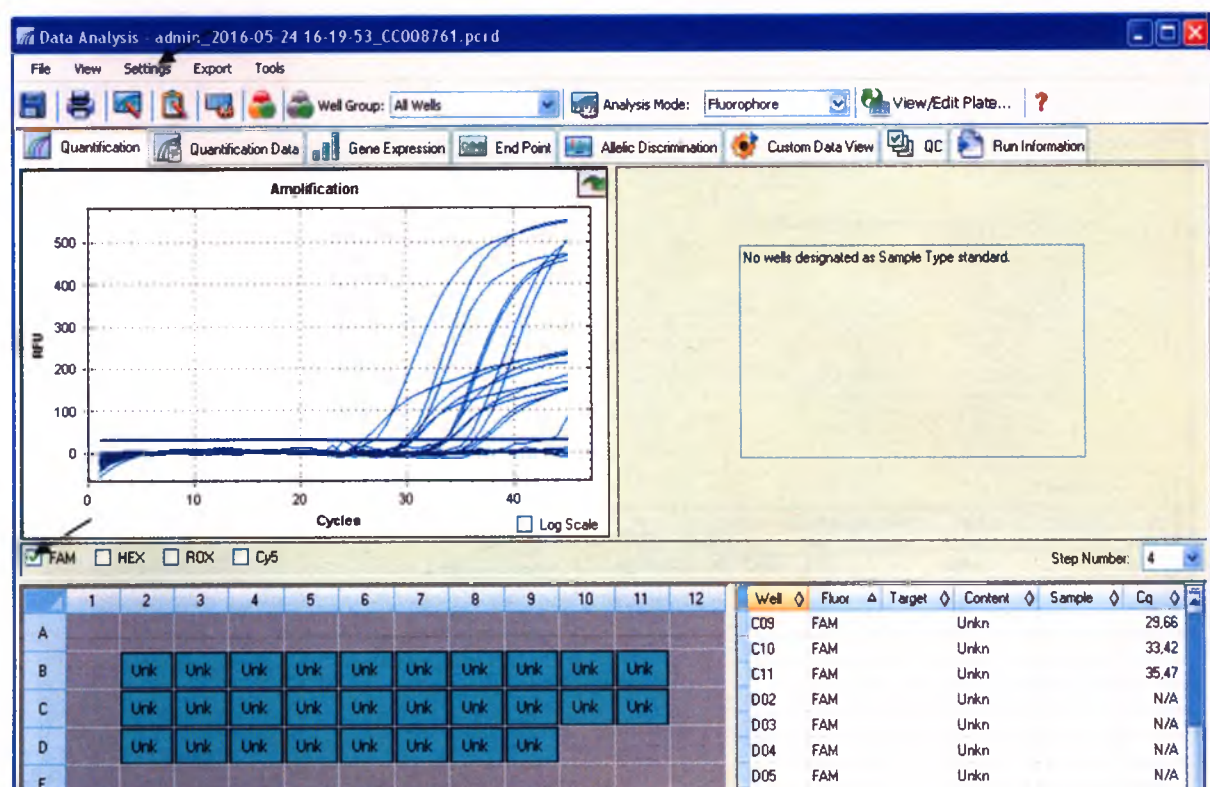
При повторном получении значений C_t в пределах более 26 но менее 30 хотя бы по одному из каналов в случае исследования бактериальных суспензий холерных вибрионов анализ осуществляют еще раз, начиная с этапа выделения ДНК.

7.3.5. Регистрация и учет результатов со смесями РС-эпид и РС-таксон на приборах типа CFX 96

Учет данных по каналам для ПЦР-смеси-эпид и ПЦР-смеси-таксон проводят единообразно.

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM (CFX):

1. Оставляем выделенным галочкой только флуорофор «FAM». Для выбора пороговой линии Threshold нажимают кнопку «Setting» в окне с учетом результатов реакции и выбирают функцию «Baseline Threshold». В открывшемся окне выбирают вместо автоматического расчета значений пороговой линии функцию «User Defined» (внизу окна) и выставляют значение 60,0.



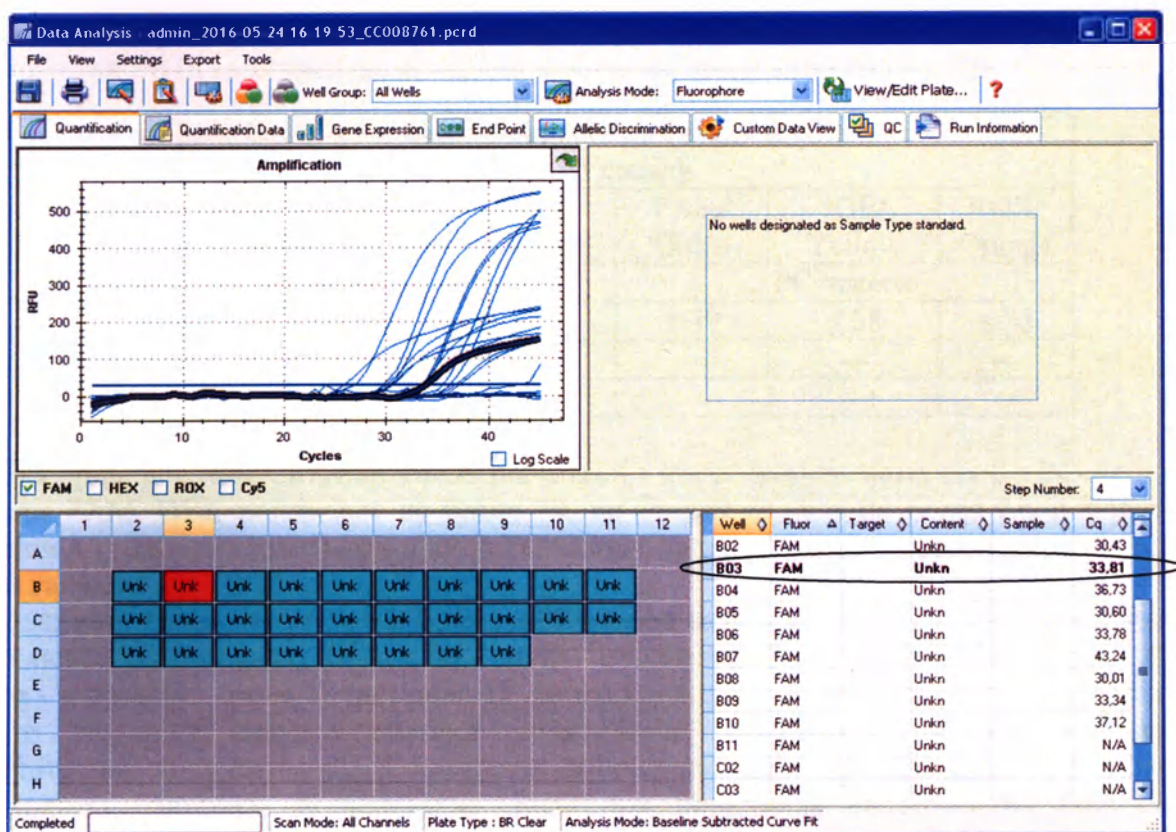
The 'Baseline Threshold' dialog box is shown. It has two tabs: 'Baseline Cycles' and 'Single Threshold'. The 'Baseline Cycles' tab is active, showing a table with columns: Well, Fluor, Baseline Begin, and Baseline End. The table lists data for wells B02 through C05.

Well	Fluor	Baseline Begin	Baseline End
B02	FAM	2	26
B03	FAM	2	28
B04	FAM	2	31
B05	FAM	2	26
B06	FAM	2	22
B07	FAM	2	41
B08	FAM	2	26
B09	FAM	2	29
B10	FAM	2	33
B11	FAM	2	44
C02	FAM	2	44
C03	FAM	2	44
C04	FAM	2	22
C05	FAM	2	44

Below the table, there are fields for 'All Selected Rows', 'Begin' (45), and 'End' (1). A button 'Reset All User Defined Values' is also present.

The 'Single Threshold' tab is also visible, showing options for 'Auto Calculated' (3.08) and 'User Defined' (30.00).

3. Выделяя курсором выделенные ячейки, где были установлены пробирки, определяют значения Ct (в правом нижнем углу окна). Кривая флуоресценции и значения Ct для выделенной пробы выделены цветом.



Регистрация результатов амплификации по каналу HEX(CFX):

1. Оставляют выделенным галочкой только флуорофор «HEX».
2. Для выбора пороговой линии Threshold нажимают кнопку «Setting» в окне с учетом результатов реакции и выбирают функцию «Baseline Threshold». В открывшемся окне выбирают вместо автоматического расчета значений пороговой линии функцию «User Defined» (внизу окна) и выставляют значение 60,0.

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX(CFX):

1. Оставляют выделенным галочкой только флуорофор «ROX».
2. Для выбора пороговой линии Threshold нажимают кнопку «Setting» в окне с учетом результатов реакции и выбирают функцию «Baseline Threshold». В открывшемся окне выбирают вместо автоматического расчета значений пороговой линии функцию «User Defined» (внизу окна) и выставляют значение 70,0.

Учет результатов со смесями РС-эпид и РС-таксон на приборах типа CFX

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительного, отрицательного контролей и отрицательного контроля выделения и таблица интерпретации данных анализа с использованием РС –эпид и РС-таксон на приборах типа CFX.

К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительного (К+), отрицательного (К-) контролей амплификации и ОКВ.

Контроли	Значения порогового цикла (Ct)					
	по каналу					
	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange
	PC-эпид			PC-таксон		
К+	≤ 39	≤ 39	≤ 38	≤ 39	≤ 38	≤ 38
К-	—	—	—	—	—	—
ОКВ	—	—	—	—	—	—

Для приборов типа CFX пороговое значение Ct для положительных проб с PC-эпид по каналам FAM, HEX составляет не более 39, по каналу ROX – не более 38, пороговое значение Ct для положительных проб с PC-таксон по каналу FAM – составляет не более 39, по каналам HEX и ROX – не более 38.

Если хотя по каналу FAM с PC-эпид и PC-таксон выявлено значение в пределах более 39 но менее 42, по каналу HEX с PC- эпид – в пределах более 39 но менее 42, а с PC-таксон - в пределах более 38 но менее 42, по каналу ROX – в пределах более 38 но менее 42, то результат анализа считают невалидным, поскольку в пробе находится недостаточное количество ДНК холерных вибрионов для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование. Если при повторном исследовании получены значение (Ct) с PC-эпид по каналам FAM, HEX не более 39, по каналу ROX – не более 38, а с PC-таксон по каналу FAM –не более 39, по каналам HEX и ROX – не более 38, то результат считают положительным.

При повторном получении значений Ct в пределах более 38-39 но менее 42 в зависимости от канала в случае исследования нативных проб осуществляют их исследование после первичного или вторичного обогащения в жидкой питательной среде, или проводят концентрирование клеток вибрионов в исследуемом материале путем центрифугирования или фильтрации. Анализ осуществляют с этапа выделения ДНК. При отсутствии повышения значений Ct результат считают отрицательным.

При повторном получении значений Ct в пределах более 38-39 но менее 42 в зависимости от канала в случае исследования бактериальных суспензий холерных вибрионов анализ осуществляют еще раз, начиная с этапа выделения ДНК.

Таблица интерпретации данных анализа с использованием РС –эпид и РС-таксон на приборах типа CFX

Пробы	Значения порогового цикла (Ct) по каналу						Результат анализа
	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange	FAM/ Green	JOE/ Yellow	ROX/ Orange	
	ctxA	tcpAB	hlyA	wbeN O1	wbfR O139	lolB	
	PC-эпид			PC-таксон			
Исследуемые пробы	< 39	< 39	—	<39	—	< 38	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> O1 классического биовара (ctxA+ tcpA+)
	< 39	< 39	< 38	< 39	—	< 38	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор (ctxA+ tcpA+). Требуется продолжение исследований с ПЦР-смесями B203C и B203T
	< 39	< 39	< 38	—	< 38	< 38	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> O139 (ctxA+ tcpA+)
	—	—	< 38	<39	—	< 38	В пробе выявлена ДНК эпидемически безопасных штаммов <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор (ctxA- tcpA-).
	—	—	< 38	—	< 38	< 38	В пробе выявлена ДНК эпидемически безопасных штаммов <i>V. cholerae</i> O139 (ctxA- tcpA-).
	—	< 39	< 38	<39	—	< 38	В пробе выявлена ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор (ctxA- tcpA+). Эпидемическая значимость требует уточнения.
	< 39	< 39	< 38	—	—	< 38	В пробе выявлена ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> не-O1 не-O139 (ctxA+ tcpA+). Могут вызвать спорадические случаи заболевания.
	—	—	< 38	—	—	< 38	В пробе выявлена ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> не-O1 не-O139 серогруппы (ctxA- tcpA-). Могут вызвать спорадические случаи заболевания.
	При значении Ct по одному или нескольким каналам						Результат невалидный.
	>39 – <42	>39 – <42	> 38 – <42	>39 – <42	>38 – <42	>38 – <42	В пробе выявлена ДНК холерных вибрионов в количестве недостаточном для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование, в том числе с использованием проб после первичного или вторичного обогащения в жидкой питательной среде, или провести концентрирование клеток вибрионов в пробе.
—	—	— или < 38	—	—	—	В пробе ДНК холерных вибрионов не обнаружена	

Пример учета и интерпретации результатов анализа на приборе типа CFX представлены в приложении 2.

7.3.6. Определение типа *ctxV* гена у штаммов холерных вибрионов O1 биовара эльтор эпидемически опасные

Подготовка реакционных пробирок со смесями PC-B203C и PC-B203T

Из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь-B203C, ПЦР-смесь-B203T, ПЦР-смесь-аллель, ТЕ-буфер, из морозильной камеры извлекают Taq ДНК-полимеразу, ПКО ДНК *ctxBeltor* и ПКО ДНК *ctxBclass*. Пробирки с ПКО ДНК *ctxBeltor*, ПКО ДНК *ctxBclass* полностью оттаивают, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки.

Определяют количество реакций в эксперименте из расчета: количество исследуемых проб, ОКВ, положительные контроли (K+ *ctxBeltor*, K+ *ctxBclass*) и отрицательный контроль (K-) для каждой реакционной смеси.

В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционные смеси PC- B203C и PC- B203T из расчета, что на 1 реакцию необходимо:

Реакционная смесь	Реагент	Объем, мкл
PC- B203C	ПЦР-смесь-B203C	5
	ПЦР-смесь-аллель	10
	Taq ДНК-полимераза	0,4
PC- B203T	ПЦР-смесь-B203T	5
	ПЦР-смесь-аллель	10
	Taq ДНК-полимераза	0,4

Подготовленные смеси тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе.

Для проведения реакции в штатив отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл для PC- B203C и PC- B203T. Затем в пробирки вносят по 15 мкл подготовленных реакционных смесей.

Затем в пробирки вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и ОКВ. В микропробирку с отрицательным контролем амплификации (K-) для каждой реакционной смеси вносят 10 мкл ТЕ-буфера, в микропробирку с положительным контролем амплификации (K+*ctxBclass*) - 10 мкл ПКО ДНК *ctxBclass*, в микропробирку с положительным контролем амплификации (K+ *ctxBeltor*) - 10 мкл ПКО ДНК *ctxBeltor*.

Проведение термоциклирования со смесями PC-B203C и PC-B203T

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер.

Программирование амплификатора типа RotorGene осуществляют аналогично как при использовании PC-эпид и PC-таксон (п. 4.3.2.5)

Программирование амплификаторов типа CFX

1. Включают прибор и дожидаются окончания автоматической калибровки прибора.
2. Запускают программу «CFX Manager».
3. Выбирают новый эксперимент «Create a New Run».
4. Задают программу амплификации (активно окно «Protocol»), используя либо уже готовый шаблон – кнопка «Select Existing», либо создают новый – кнопка «Creative New».

5. В случае создания нового шаблона вводят значения температуры и времени каждого шага, исходя из следующего: предварительная денатурация при 95 °C – 5 мин, 95 °C – 20 с, 59 °C – 20 с, , 72 °C – 25 с, вставка функция «Add Plate Read to Step», вставка функции «GOTO» 2 – 39 цикла. После окончания ввода данных нажимают кнопку «OK».

Для последующих исследований шаблон может быть сохранен путем нажатия кнопки «Save».

6. Задают условия эксперимента (активно окно «Plate»), используя либо уже готовый шаблон – кнопка «Select Existing», либо создают новый – кнопка «Creative New».

7. В случае создания новой плашки выбирают флуорофор SybrGreen по которому будет проводится регистрация флуоресценции, нажимают кнопку «Select Fluorophores». Затем с помощью левой кнопки мыши выделяют ячейки в которые установлены пробирки (при выделении ячейки окрашиваются в темно-серый цвет). Указывают тип образцов, для чего нажимают кнопку «Sample Type» и выбирают «Unknown». Нажимают галочки в окнах рядом с обозначенным флуорофором. Нажимают кнопку «OK» и сохраняют файл с условиями эксперимента.

8. Запускают амплификацию (активно окно «Start Run») нажимаю кнопку «Start Run» и сохраняют в соответствующей папке протокол.

7.3.7. Регистрация результатов со смесями PC-B203C и PC-B203T

Учет данных по каналу FAM для ПЦР-смеси-B203C и ПЦР-смеси-B203T проводят единообразно.

Регистрация результатов на приборах типа RotorGene по каналу FAM/Green:

Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», нажимают кнопку «Show»/«Показать».

Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.

В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».

Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).

В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 15 %.

В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,1.

В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов на приборах типа CFX 96

1. Для выбора пороговой линии Threshold нажимают кнопку «Setting» в окне с учетом результатов реакции и выбирают функцию «Baseline Threshold». В открывшемся окне выбирают вместо автоматического расчета значений пороговой линии функцию «User Defined» (внизу окна) и выставляют значение 30,0.

2. В таблице результатов (правый нижний угол) появятся значения Ct.

7.3.8. Учет результатов со смесями PC-B203C и PC-B203T

Учет результатов со смесями PC-B203C и PC-B203T на приборах типа RotorGene и CFX осуществляется по одной схеме.

Результаты учитывают на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct») и определения разницы в значениях Ct, полученных со смесями PC- B203C и PC-B203T.

К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительных (К+), отрицательных (К-) контролей амплификации.

ПКО	Значения Ct с РС-B203C и РС-B203T	Разница значений	
		Ct _{B203C} -Ct _{B203T}	Ct _{B203C} /Ct _{B203T}
ПКО ДНК <i>V. cholerae</i> <i>ctxBclass</i>	любое	больше чем на - 4 и более циклов	≤ в 0,8 и более раз
ПКО ДНК <i>V. cholerae</i> <i>ctxBeltor</i>	любое	больше чем на +4 и более циклов	≥ в 1,2 и более раз
К-	ОФ	Нет значений	Нет значений

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей.

Пробы	Значения Ct		Разница значений		Результат анализа
	PC-B203C	PC-B203T	Ct _{B203C} -Ct _{B203T}	Ct _{B203C} /Ct _{B203T}	
Исследуемые пробы	любое	любое	больше чем на - 4 и более циклов	≤ в 0,8 и более раз	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> биовара эльтор, <i>ctxB</i> ген генетически измененный
	любое	ОФ	н/и	н/и	
	любое	любое	больше чем на +4 и более циклов	≥ в 1,2 и более раз	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> биовара эльтор, <i>ctxB</i> ген типичный
	ОФ	любое	н/и	н/и	
Примечание: н/и – не определяют					

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Условия хранения компонентов набора реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ» – ПЦР-смесь-эпид, ПЦР-смесь-таксон, ПЦР-смесь-B203C, ПЦР-смесь-B203T, ПЦР-смесь-РГФ, ПЦР-смесь-аллель, ТЕ-буфер, ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ, ПКО ДНК *ctxBeltor*, ПКО ДНК *ctxBclass* при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С, Таq ДНК-полимераза - при температуре от минус 16 до минус 20 °С.

Транспортирование набора реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ» осуществляют всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями ГОСТ 15150 и правилами, установленными для каждого вида транспорта. Условия транспортирования - при температуре от 2 до 8 °С не более 2 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С – неограниченно.

Срок годности набора реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ» - 6 месяцев.

Срок годности ПКО ДНК *V. cholerae* -РГФ, ПКО ДНК *ctxBeltor*, ПКО ДНК *ctxBclass* после разведения - 6 месяцев при хранении при температуре от минус 16 до минус 20 °С.

Условия эксплуатации набора реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ» – при температуре от 18 до 25 °С.

9. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «ГенХол - идентификация – РГФ» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

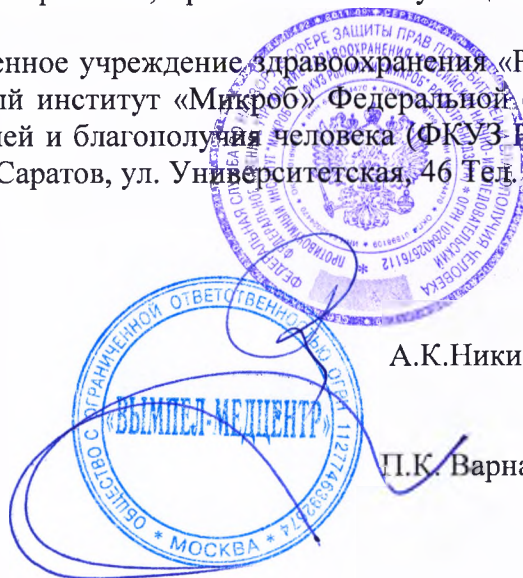
Производитель - Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46 Тел. (845-2) 51-69-65).

Зам. директора по экспериментальной и
производственной работе ФКУЗ
РосНИПЧИ «Микроб»

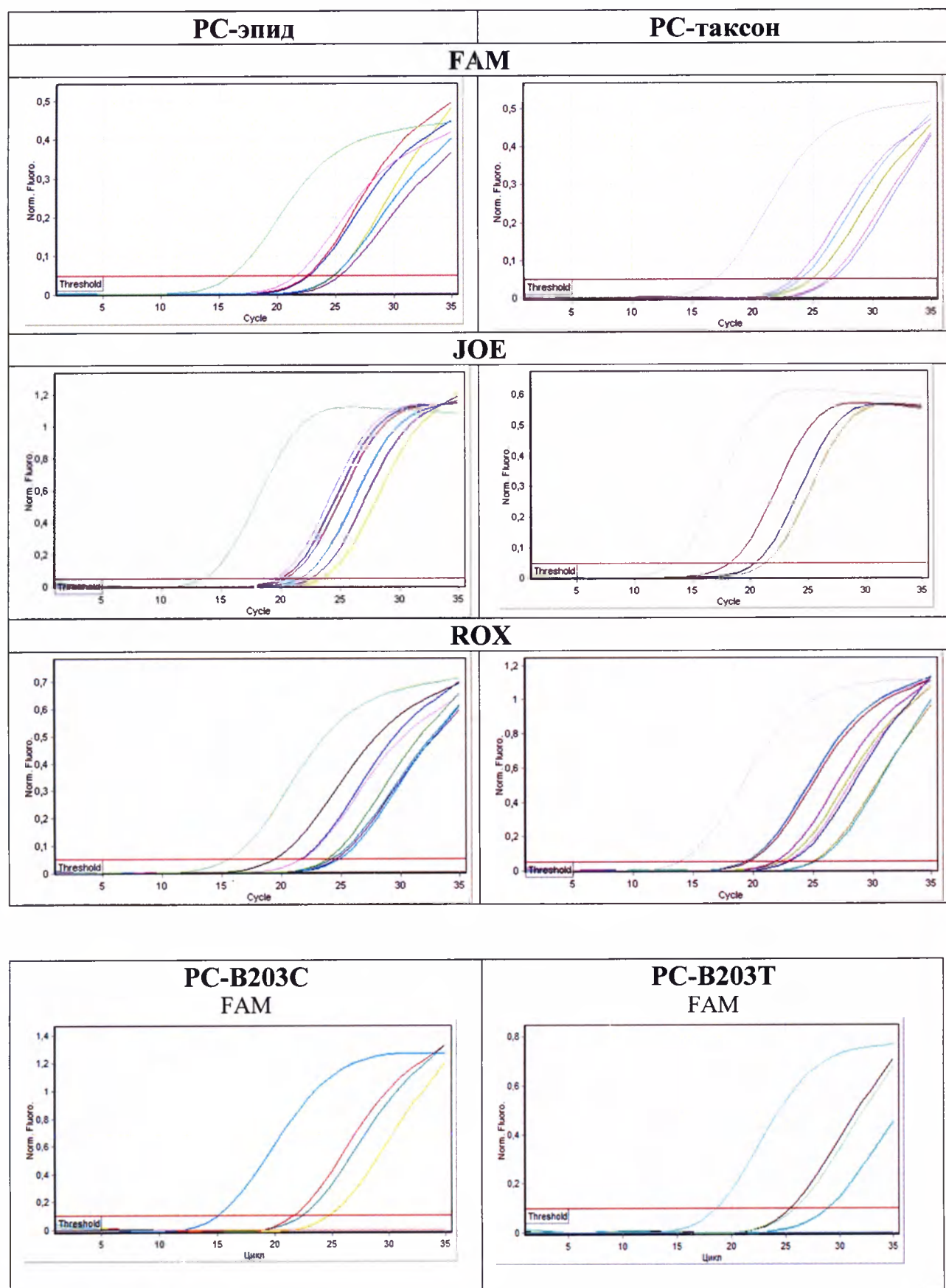
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

А.К.Никифоров

П.К. Варнавичус



Пример регистрации, учета и интерпретации результатов с использованием набора реагентов «ГенХол-идентификация-РГФ» на приборах типа RG



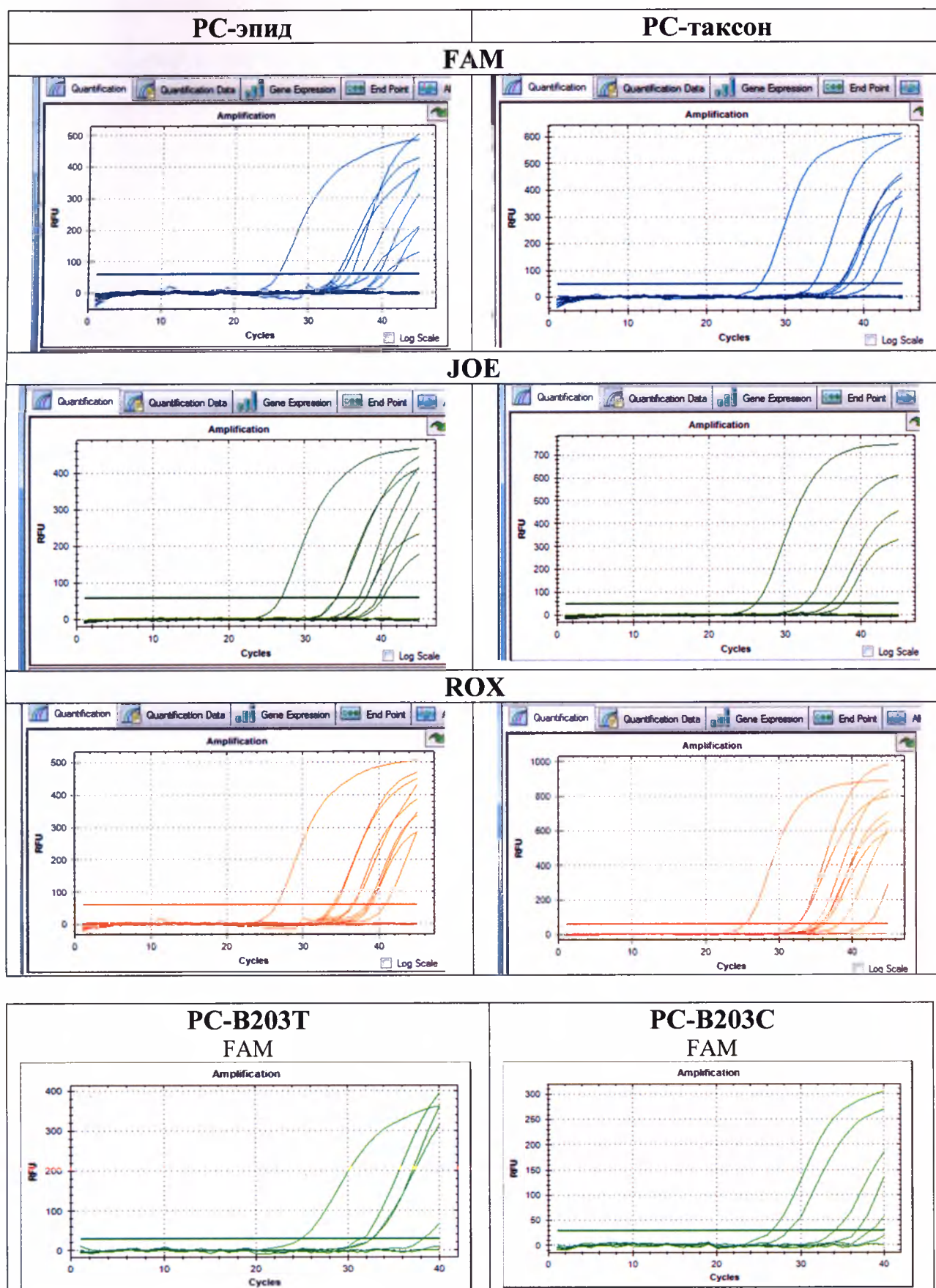
Проба	РС-эпид			РС-таксон			Интерпретация результата
	FAM	HEX	ROX	FAM	HEX	ROX	
	ctxA	tcpAB	hlyA	wbeN	wbfR	lolB	
1	22,63	20,41	-	24,00	-	19,34	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+ tcpAB+) O1 серогруппы классического биовара
2	27,26	23,67	26,19	26,70	-	-	Результат невалидный. В пробе выявлена ДНК холерных вибрионов в количестве недостаточном для проведения идентификации
3	-	-	-	-	-	-	В пробе ДНК холерных вибрионов не выявлена
4	22,78	20,03	21,59	23,45	-	19,62	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+ tcpAB+) O1 серогруппы биовара эльтор
5	21,67	19,54	21,70	-	18,26	22,31	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+ tcpAB+) O139 серогруппы
6	-	-	24,19	24,93	-	19,31	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpAB-) O1 серогруппы биовара эльтор
7	-	-	23,83	-	20,45	22,09	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpAB-) O139 серогруппы
8	-	-	19,38	-	-	21,77	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpAB-) не-O1 не-O139 серогруппы
K+	16,05	13,49	15,58	16,89	13,39	13,85	☒ - результаты подлежат учету
K-	-	-	-	-	-	-	☒ - результаты подлежат учету
OKB	-	-	-	-	-	-	☒ - результаты подлежат учету

ПКО	Значения Ct PC-B203C/ PC-B203T	Разница значений		Результаты подлежат учету	Результаты не подлежат учету
		Ct _{B203C} -Ct _{B203T}	Ct _{B203C} /Ct _{B203T}		
ПКО ДНК <i>V. cholerae</i> ctxBclass	14,46/ 25,20	-10,74	0,58	☒	☐
ПКО ДНК <i>V. cholerae</i> ctxBeltor	22,01/ 17,82	4,19	1,24	☒	☐
K-	ОФ	Нет значений	Нет значений	☒	☐

Пробы	Значения Ct		Разница значений		Результат анализа
	PC-B203C	PC-B203T	Ct _{B203C} -Ct _{B203T}	Ct _{B203C} /Ct _{B203T}	
1	21,40	-	н/и	н/и	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> биовара эльтор, ctxB ген генетически измененный
2	26,04	-	н/и	н/и	
3	-	24,42	н/и	н/и	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> биовара эльтор, ctxB ген типичный
4	-	27,90	н/и	н/и	

Примечание: н/и – не определяют

Пример регистрации, учета и интерпретации результатов с использованием набора реагентов «ГенХол-идентификация-РГФ» на приборах типа CFX



Проба	РС-эпид			РС-таксон			Интерпретация результата
	FAM	HEX	ROX	FAM	HEX	ROX	
	ctxA	tcpAB	hlyA	wbeN	wbfR	lolB	
1	35,86	37,07	-	37,07	-	36,66	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+ tcpAB+) O1 серогруппы классического биовара
2	39,53	39,61	-	41,00	-	-	Результат невалидный. В пробе выявлена ДНК холерных вибрионов в количестве недостаточном для проведения идентификации
3	-	-	-	-	-	-	В пробе ДНК холерных вибрионов не выявлена
4	34,53	34,19	34,26	33,57	-	33,29	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+ tcpAB+) O1 серогруппы биовара эльтор
5	33,94	34,14	33,96	-	32,49	33,42	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+ tcpAB+) O139 серогруппы
6	-	-	37,38	36,91	-	37,07	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpAB-) O1 серогруппы биовара эльтор
7	-	-	37,64	-	36,53	35,87	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpAB-) O139 серогруппы
8	-	-	36,90	-	-	37,06	В пробе выявлена ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpAB-) не-O1 не-O139 серогруппы
K+	26,06	26,87	26,54	26,80	26,11	26,15	☒ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету
K-	-	-	-	-	-	-	☒ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету
OKB	-	-	-	-	-	-	☒ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету

ПКО	Значения Ct РС- B203C/ РС-B203T	Разница значений		Результаты подлежат учету	Результаты не подлежат учету
		Ct _{B203C} -Ct _{B203T}	Ct _{B203C} /Ct _{B203T}		
ПКО ДНК <i>V. cholerae</i> ctxBclass	23,92/ 29,57	-5,65	0,80	☒	☐
ПКО ДНК <i>V. cholerae</i> ctxBeltor	32,47/ 26,57	5,9	1,22	☒	☐
K-	ОФ	Нет значений	Нет значений	☒	☐

Пробы	Значения Ct		Разница значений		Результат анализа
	РС- B203C	РС- B203T	Ct _{B203C} - Ct _{B203T}	Ct _{B203C} / Ct _{B203T}	
1	38,27	34,13	4,14	1,12	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> биовара эльтор, <i>ctxB</i> ген типичный
2	-	36,74	н/и	н/и	
3	32,69	-	н/и	н/и	В пробе выявлена ДНК эпидемически значимых штаммов <i>V. cholerae</i> биовара эльтор, <i>ctxB</i> ген генетически измененный
4	32,58	38,45	-5,87	0,84	
Примечание: н/и – не определяют					

Прошито и пронумеровано
двадцать один (21) листа (ов).
Начальник отдела делопроизводства
Косолапова Р.Н.
(подпись)
«К» 04 20 18 года
М.П.