

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для обнаружения ДНК
бактериальных патогенов, ассоциированных с септициемией,
методом полимеразной цепной реакции

СЕПТОСКРИН

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов **СЕПТОСКРИН** предназначен для качественного обнаружения ДНК микроорганизмов *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* в биологическом материале (соскобы эпителиальных клеток задней стенки глотки; осадок мочи, сперма, отделяемое простаты, смывы из бронхов, мокрота, цельная кровь) методом полимеразной цепной реакции.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2. Набор реагентов **СЕПТОСКРИН** может быть использован в клинической диагностике носительства гноеродных бактерий, а также для оценки эффективности терапии.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 10 или 60 образцов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы и имеет разные форматы, отличающиеся способом детекции амплифицированного фрагмента ДНК: методом электрофореза в агарозном геле «формат ЭФ» и флуоресцентной детекции методом гибридизации с зондами форматы «по конечной точке» или «в реальном времени». Набор выпускается в комплектации «OneStep» (состоит из полностью готовой амплификационной смеси под слоем масла, раскапанной в амплификационные пробирки).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

2.1.1. Набор реагентов **СЕПТОСКРИН** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК микроорганизмов путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Постановка реакции ПЦР-амплификации.

3. Детекция продуктов амплификации. Осуществляется двумя способами в зависимости от формата набора:

- методом электрофореза в агарозном геле (формат ЭФ);
- методом флуоресцентной детекции (форматы «по конечной точке» или «в реальном времени»).

Флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации ДНК-фрагмента в процессе реакции. Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

2.2. Состав набора

В состав набора реагентов входят три комплекта:

2.2.1. Комплект для пробоподготовки (выделение ДНК):

Реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции (ДНК-ЭКСПРЕСС) - на 100 анализируемых проб.

Комплект ДНК-ЭКСПРЕСС состоит из 100 пробирок типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащих по 300 мкл реагента.

2.2.2. Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации.

Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации представляет собой 8 амплификационных смесей, готовых к применению и расфасованных по индивидуальным пробиркам.

Данные комплекты выпускаются в различных форматах детекции («ЭлектроФорез», «по конечной точке», «в реальном времени») (табл. 1).

Таблица 1

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
«ЭлектроФорез» ЭФ «OneStep»	1. Амплификационная смесь КОЛИПОЛ 2. Амплификационная смесь ЭНТЕРОПОЛ 3. Амплификационная смесь ПРОТЕПОЛ 4. Амплификационная смесь СЕРАТИПОЛ 5. Амплификационная смесь АРУГИПОЛ 6. Амплификационная смесь ЭНКОПОЛ 7. Амплификационная смесь СТАФИПОЛ 8. Амплификационная смесь СТРЕПТОПОЛ 9. Комплект положительных контрольных образцов 10. Разбавитель	10 пробирок - по 20 мкл 10 пробирок - по 20 мкл 10 пробирок - по 20 мкл 10 пробирок - по 20 мкл 10 пробирок - по 20 мкл 10 пробирок - по 20 мкл 10 пробирок - по 20 мкл 10 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 55 мкл 2 пробирки – по 100 мкл
«по конечной точке» КТ «OneStep»	1. Амплификационная смесь КОЛИПОЛ 2. Амплификационная смесь ЭНТЕРОПОЛ 3. Амплификационная смесь ПРОТЕПОЛ 4. Амплификационная смесь СЕРАТИПОЛ 5. Амплификационная смесь АРУГИПОЛ 6. Амплификационная смесь ЭНКОПОЛ 7. Амплификационная смесь СТАФИПОЛ 8. Амплификационная смесь СТРЕПТОПОЛ 9. Фоновая смесь 10. Комплект положительных контрольных образцов 11. Разбавитель	8 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 20 мкл 16 пробирок - по 20 мкл 8 пробирок - по 55 мкл 2 пробирки – по 100 мкл
«в реальном времени» РВ «OneStep»	1. Амплификационная смесь КОЛИПОЛ 2. Амплификационная смесь ЭНТЕРОПОЛ 3. Амплификационная смесь ПРОТЕПОЛ 4. Амплификационная смесь СЕРАТИПОЛ 5. Амплификационная смесь АРУГИПОЛ 6. Амплификационная смесь ЭНКОПОЛ 7. Амплификационная смесь СТАФИПОЛ 8. Амплификационная смесь СТРЕПТОПОЛ 9. Комплект положительных контрольных образцов 10. Разбавитель	10 пробирок - по 40 мкл 10 пробирок - по 40 мкл 10 пробирок - по 40 мкл 10 пробирок - по 40 мкл 10 пробирок - по 40 мкл 10 пробирок - по 40 мкл 10 пробирок - по 40 мкл 10 пробирок - по 40 мкл 8 пробирок по 110 мкл 2 пробирки – по 100 мкл

Комплекты для проведения амплификации включают готовые к применению реагенты.

В состав амплификационной смеси входят:

- раствор дНТФ;

- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- Taq-полимераза;
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, качество забора материала и выделения ДНК;

- флуоресцентные зонды (форматы «КТ» и «РВ»):
 - зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор FAM,
 - зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;

Комплект реагентов для амплификации (по желанию клиента) может быть представлен в варианте фасовки только одного из 8 видов амплификационных смесей (табл.2) .

Таблица 2

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
«Электрофорез» ЭФ «OneStep»	1. Амплификационная смесь 2. Положительный контрольный образец ДНК 3. Разбавитель	60 пробирок по 20 мкл 1 пробирка – 55 мкл 1 пробирка – 100 мкл
«по конечной точке» КТ «OneStep»	1. Амплификационная смесь 2. Фоновая смесь 3. Положительный контрольный образец ДНК 4. Разбавитель	54 пробирки по 20 мкл 6 пробирок по 20 мкл 1 пробирка – 55 мкл 1 пробирка – 100 мкл
«в Реальном Времени» РВ «OneStep»	1. Амплификационная смесь 3. Положительный контрольный образец ДНК 4. Разбавитель	60 пробирки по 40 мкл 1 пробирка – 110 мкл 1 пробирка – 100 мкл

2.2.3. Комплект реагентов для электрофоретической детекции.

Таблица 3

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Комплект №1	1. Агароза 2. Раствор бромистого этидия 3. 50-кратный ТАЕ-буфер	1 флакон – 4,0 г 1 пробирка – 30 мкл 2 флакона - по 13 мл
Комплект №2	1. 2% агарозный гель (40 лунок) 2. 50-кратный ТАЕ-буфер	3 планшета 1 флакон – 25 мл

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

100% специфичность.

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

3.2. Чувствительность анализа

С помощью набора СЕПТОСКРИН можно обнаружить 10^4 геном-эквивалентов/мл и более ДНК-матриц *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* (каждого из видов) в пробе, прошедшей обработку (выделение ДНК).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и 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».

4.4. Удаление неиспользованных реактивов проводить в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

5. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из биопробы

- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб ДНК-ЭКСПРЕСС;
- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- стерильные центрифужные пробирки вместимостью 15 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»;

3-й этап - детекция продуктов амплификации.

Методом электрофореза в агарозном геле для формата Электрофорез.

- комплект реагентов для электрофоретической детекции (комплект № 1 или комплект № 2)
- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;
- УФ-транслюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- весы технические;
- вода дистиллированная;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- емкость пластиковая большого объема для дезактивации буфера и гелей.

Методом флуоресцентной детекции для формата Флуоропол «по конечной точке»

- флуоресцентный детектор.

6. ПРОБОПОДГОТОВКА

6.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Образцы **соскобов и мазков** помещают непосредственно в пробирки с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС»: исследуемый материал, полученный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, содержащую 300 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС», перемешать, зонд извлечь и утилизировать, пробирку плотно закрыть.

Полученные образцы использовать в течение 2 часов для выделения ДНК. Допускается хранение проб в реагенте «ДНК-ЭКСПРЕСС» при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 суток или при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ не более 2 недель.

Образцы **спермы и секрета простаты** собирают в одноразовую сухую стерильную пробирку. Полученные образцы использовать в течение 2 часов для выделения ДНК. Допускается хранение проб при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 суток или при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ не более 2 недель.

Моча: собрать первую порцию утренней мочи в количестве 20 мл в сухой стерильный флакон с плотно закручивающейся крышкой; моча для исследования должна быть свежей (не охлаждать и не замораживать!).

Кровь: 500 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 50 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). *Гепарин использовать не рекомендуется.* Не охлажденные пробы использовать в течение 2 часов для выделения ДНК; хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 суток; *не замораживать!*

6.2. Предварительная обработка клинического материала

Образцы **соскобов** в пробирке с «ДНК-ЭКСПРЕСС» не требуют предварительной обработки.

Образцы **спермы и секрета простаты:** 20-30 (максимум 50) мкл жидкого образца внести в пробирку с 300 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС».

Получение **осадка мочи:**

- весь объем мочи тщательно перемешать и 10-15 мл отобрать в стерильную центрифужную пробирку. Центрифугировать в течение 15-20 минут при 1500-3000 об/мин при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$), надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить осадок;

- суспензию осадка (0,5-1 мл) перенести со дна в одноразовую пробирку вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, пробирку плотно закрыть и центрифугировать при 8000-12000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 секунд;

- тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость;

- при необходимости можно однократно промыть осадок: добавить к осадку 200-300 мкл физиологического раствора, ресуспендировать на вортексе, центрифугировать при 8000 – 12000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 секунд и удалить надосадочную жидкость;

- к осадку в пробирке добавить все содержимое (300 мкл) из одной пробирки с «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

Пробирку с образцом **крови** с антикоагулянтом аккуратно встряхнуть, центрифугировать в течение 5 минут при 3000 об/мин при комнатной температуре. Плазму (верхняя фаза) отбрасывают с использованием индивидуального наконечника. Полученную клеточную массу крови (нижняя фаза) необходимо отмыть от эритроцитов. Методика отмывки. К 300 мкл осадка клеточной массы крови добавить 1 мл буфера (10мМ трис-HCl, 5мМ MgCl_2 , 10мМ NaCl) и оставить на 20 минут при комнатной температуре до полного гемолиза эритроцитов. Отцентрифугировать при комнатной температуре 5 минут при 3000 об/мин. Процедуру повторить 2 раза. К осадку в пробирке, объем которого не должен превышать 50 мкл, добавить весь объем (300 мкл) реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» из одной пробирки, тщательно перемешать пипетированием, образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

Хранение предварительно обработанных проб в реагенте «ДНК-ЭКСПРЕСС»: при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 суток или при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ не более 2 недель.

6.3. Выделение ДНК.

6.3.1. Пробирку с реагентом ДНК-ЭКСПРЕСС, содержащую анализируемый материал, тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10 секунд.

6.3.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат предварительно прогретый до температуры + 98°С, и прогреть при температуре + 98°С в течение 20 минут.

Примечание: перед помещением пробирок в термостат необходимо проверить, чтобы во всех пробирках был зашелкнут замочек на крышках. Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру процесса не менее + 98°С.

6.3.3. После прогрева пробирки перенести в центрифугу и центрифугировать при 12000-16000 g (8000 - 12000 об/мин) при комнатной температуре в течение 15 секунд.

6.3.4. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

Полученные пробы можно хранить при температуре +2-8°С не более одной недели или при температуре -18...-20°С не более 6 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение ПЦР-амплификации.

7.1.1. Достать пробирки с амплификационной и фоновой смесями, положительным контролем и разбавителем из холодильника в соответствии с количеством анализируемых образцов и промаркировать их.

7.1.2. В пробирки с каждым видом амплификационной смеси добавить образцы индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами в объеме 1/4 от объема амплификационной смеси:

- а) в фоновые пробирки – разбавитель;
- б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

7.1.3. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°С) на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.4. Для проведения ПЦР с последующей электрофоретической детекцией результата перенести пробирки в прогретый до температуры +94°С программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+93°С	Пауза	
+93°С	30 сек	35 циклов
+59°С	30 сек	
+72°С	30 сек	
+10°С	Хранение	

7.1.5. В случае проведения ПЦР с детекцией результата «по конечной точке» реакции перенести пробирки в прогретый до температуры +94°С программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+94 °C	1 минута 30 секунд	5 циклов
+94 °C	10 секунд	
+64 °C	40 секунд	
+94 °C	5 секунд	35 циклов
+64 °C	30 секунд	
+10 °C	Хранение	

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов СЕПТОСКРИН.

7.1.6. При проведении ПЦР с детекцией результата «в реальном времени» амплификацию следует проводить по следующей программе:

+94 °C	1 минута 30 секунд	40 циклов
+94 °C	10 секунд	
+64 °C	11 секунд считывание	
+72 °C	20 секунд	

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Детекция продуктов амплификации

8.1.1. Проведение электрофореза

8.1.1.1. Заполнить камеру для электрофореза 1хТАЕ буфером, приготовленным на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ буфера в 50 раз.

Примечание. При использовании «Комплекта для электрофоретической детекции № 2» проведение электрофореза начинать с п. 8.1.1.5.

8.1.1.2. К 2 г агарозы добавить 2 мл 50хТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.

8.1.1.3. Расплавить агарозу на электрической плитке, или на водяной бане, или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл раствора агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия, перемешать.

8.1.1.4. Охладить агарозу до температуры +50-60°C при комнатной температуре (+18-25°C) и залить в планшет для заливки гелей. Для получения карманов в агарозном геле установить гребенку на планшет, используя зажим типа "бульдог". После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.

8.1.1.5. Нанести в карманы геля по 10 мкл продукта амплификации в последовательности, соответствующей нумерации проб.

8.1.1.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/см длины геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+).

Контроль за электрофоретическим разделением осуществлять визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта не менее 1,5-2 см.

8.1.2. Регистрация результатов электрофореза

8.1.2.1. Вынуть гель из планшета и перенести гель на стекло ультрафиолетового трансиллюминатора.

ВНИМАНИЕ! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.

8.1.2.2. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся полос оранжево-красного цвета.

ВНИМАНИЕ! Просмотр геля следует проводить только через защитный экран или защитные очки, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги и вреден для глаз.

8.1.2.3. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра.

8.2.1. Детекция продуктов амплификации «по конечной точке».

При проведении ПЦР с детекцией результатов «по конечной точке» реакции следует, по окончании реакции, перенести пробирки из амплификатора в прибор для флуоресцентной детекции результатов реакции (ПЦР-детектор) и провести измерения согласно инструкции к прибору. Анализ проводится управляющей программой ПЦР-детектора автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений.

Для ПЦР-детектора «ДЖИН-4» установлены следующие пороговые значения:

Таблица 4

Возбудитель	-	+	ВК
<i>Escherichia coli</i>	3,5	3,8	2,25
<i>Proteus spp.</i>	3,3	3,8	2,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	2,7	3,0	2,25
<i>Serratia spp.</i>	3,6	4,0	2,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2	4,8	2,25
<i>Streptococcus spp.</i>	3,5	4,0	2,25

Примечание. Приведенные характеристики и пороговые значения отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик» и ПЦР-детекторе «ДЖИН-4». По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов СЕПТОСКРИН.

8.3.1. Детекция продуктов амплификации «в реальном времени».

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ и интерпретация результатов.

9.1.1. Анализ и интерпретация результатов электрофореза.

В отрицательном контрольном образце не должно выявляться ни одной полосы оранжево-красного цвета. Появление полосы на уровне как внутреннего так и положительного контрольного образца ДНК свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

В положительном контрольном образце ДНК должна выявляться только одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая положительному контрольному образцу ДНК.

Отсутствие на электрофореграмме фрагмента, соответствующего внутреннему контролю, связано с особенностями данного набора. Внутренний контроль выявляется только в клинических образцах, так как представляет собой фрагмент геномной ДНК человека, праймеры для синтеза которого входят в состав амплификационной смеси.

Анализируемые пробы.

Отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контрольного образца ДНК свидетельствует об отсутствии ДНК микроорганизма в анализируемой пробе.

Наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контрольному образцу ДНК, свидетельствует о присутствии ДНК микроорганизма в анализируемой пробе.

Во всех отрицательных образцах должна выявляться полоса оранжево-красного цвета размером 220 п.н., соответствующая внутреннему контролю.

Размеры специфических фрагментов ампликонов представлены в таблице 5.

Таблица 5

Амплификационная смесь	Возбудитель	Положительный контроль н.п.	Внутренний контроль н.п.
КОЛИПОЛ	<i>Escherichia coli</i>	405	220
ПРОТЕПОЛ	<i>Proteus spp.</i>	798	220
АРУГИПОЛ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	309	220
ЭНКОПОЛ	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	402	220
ЭНТЕРОПОЛ	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	313	220
СЕРАТИПОЛ	<i>Serratia spp.</i>	778	220
СТАФИПОЛ	<i>Staphylococcus aureus</i>	311	220
СТРЕПТОПОЛ	<i>Streptococcus spp.</i>	315	220

Примечание. Если в пробе присутствует большое количество ДНК искомого возбудителя, то на гель-электрофореграмме должна наблюдаться интенсивная полоса на уровне положительного контрольного образца ДНК, но при этом может не наблюдаться полосы внутреннего контроля; такие пробы следует интерпретировать как положительные.

Если в анализируемом образце отсутствует как полоса, соответствующая по подвижности положительному контрольному образцу ДНК, так и полоса внутреннего контроля, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР;

неадекватная работа амплификатора; ошибка выполнения процедуры проведения анализа и др.). В этом случае необходимо провести повторный анализ, начиная со стадии выделения ДНК.

9.1.2. При проведении детекции «по конечной точке» реакции анализ проводится управляющей программой автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений. Результат выводится в соответствующем месте протокола, зависящем от конкретной программы.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

	Результат	Специфика*	ВК*	Итерпретация
К+	+	Сигнал>«+»	любой	Реакция прошла
	-	Сигнал<«-»	Сигнал> ВК	Реакция не прошла.
	нд	Сигнал<«-»	Сигнал< ВК	НЕОБХОДИМА перестановка
	?	«-»<Сигнал<«+»	любой	
К-	нд	Сигнал<«-»	Сигнал< ВК	Контаминация отсутствует
	-	Сигнал<«-»	Сигнал> ВК	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
	+	Сигнал>«+»	любой	Специфическая контаминация.
	?	«-»<Сигнал<«+»	любой	НЕОБХОДИМА перестановка.
Анализируем ый образец	+	Сигнал>«+»	любой	Положительная проба
	-	Сигнал<«-»	Сигнал> ВК	Отрицательная проба
	?	«-»<Сигнал<«+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	нд	Сигнал<«-»	Сигнал< ВК	Недостовверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
фон	фон	Не интерпретируется.		

* Сигнал соответствующего канала сравнивается со следующими пороговыми значениями:

- для специфического сигнала (Специфика) – положительным «+» и отрицательным «-» пороговыми значениями;

- для внутреннего контроля – с пороговым значением внутреннего контроля **ВК**.

В столбце *Результат* выводится качественный результат анализа, определенный на основе сравнения полученных после нормировки значений сигнала с пороговыми.

В столбцах *Специфика* и *ВК* выводятся численные значения сигнала в соответствующих каналах, нормированные на фон (усредненный фон принимается равным 1, нормировочные коэффициенты для каждого канала выводятся под соответствующим столбцом). Те же значения в графическом виде могут быть представлены на диаграмме.

Примечание. При возникновении сомнительных или недостоверных результатов, а также сообщений о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок следует проверить порядок расстановки пробирок в детекторе, а также сами пробирки на присутствие мешающих детекции факторов, и при их отсутствии еще 2 раза повторить детекцию. Корректным считать результат, зарегистрированный не менее чем в 2 измерениях из 3.

9.1.3. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в реальном времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции следует экспортировать данные, полученные управляющей программой, и далее анализировать их в программе, предназначенной для анализа результатов.

Пороговая линия для отсечки шума и анализа выбирается согласно таблице 7.

Таблица 7

Образец ДНК	Флуорофор	Пороговая линия	Конечный цикл
Внутренний контроль	HEX	80	35
<i>Escherichia coli</i>	FAM	100	35
<i>Proteus spp.</i>	FAM	100	35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	100	35
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	FAM	100	35
<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	FAM	100	35
<i>Serratia spp.</i>	FAM	100	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	FAM	100	35
<i>Streptococcus spp.</i>	FAM	100	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

9.1.3. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8.

	Ct FAM	Ct HEX	Результат
К+	< КЦ	любой	Специфическая реакция прошла
	N/A или > КЦ	любой	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	< КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
К-	N/A или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	N/A или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
Анализируемый образец	< КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	N/A или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	N/A или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – (обозначение программного обеспечения прибора) пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

КЦ – конечный цикл – пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией после него полностью аналогично ситуации, когда пересечение не зарегистрировано вовсе.

Примечание. Приведенные характеристики КЦ и пороговые значения представлены на примере прибора ICycler IQ5 (BioRad). По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов СЕПТОСКРИН.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до +25°C не более 5 суток.

10.2. Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 1 суток.

10.3. Комплект для электрофоретической детекции № 1 должен храниться при комнатной температуре (+18-25°C) в течение всего срока годности, комплект № 2 - при температуре +2-8°C в течение всего срока годности.

10.4. Срок годности набора - 4 месяца.

10.5. Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре +2-8°C не более одной недели или при температуре 18-20°C не более 6 месяцев.

10.6. 1xTAE буфер можно хранить при комнатной температуре не более 1 недели.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495) 258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Разработчик

Атрошкина М.Е.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической

лабораторной диагностики

ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России



Долгов В.В.

Подпись

удостоверяю:

Специалист по кадрам РМАПО

Подпись

" " 20 ____ года

Прошито, проверено, скреплено печатью.
Количество листов _____ шт.
Директор _____ Наумов А.Ю.

