

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *энтерогеморрагических E.coli (EHEC)*
в продуктах питания методом полимеразной цепной реакции
(ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® EHEC-FL»

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

АмплиСенс®



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



Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	8
ФОРМАТ FEP	9
СОСТАВ	9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	9
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	10
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ».....	13
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	13
ФОРМАТ FRT	16
СОСТАВ	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	17
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	20
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	22
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>EHEC</i>	- энтерогеморрагические <i>E. coli</i>
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *EHEC-FL*» не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для проведения полимеразной цепной реакции с амплификацией ДНК генов шигоподобных токсинов 1 и 2 типов (Stx1/2) *EHEC* и *Shigella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Данный комплекс микроорганизмов может ассоциироваться с заболеваниями, протекающими в форме геморрагического колита (НС) и гемолитико-уремического синдрома (HUS).

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из среды для первичного обогащения исследуемого продукта питания, проведенного на жидких селективных средах для выделения энтерогеморрагических *E. coli* в соответствии с действующей нормативно-методической документацией.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК генов шигоподобных токсинов 1 и 2 типов (Stx1/2) *EHEC* и *Shigella* spp. методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракция (выделение) ДНК из образцов исследуемого материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция ДНК из исследуемого материала проводится в присутствии внутреннего контрольного

образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Пробы ДНК используются для амплификации участка ДНК перечисленных выше возбудителей при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

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

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК генов шигоподобных токсинов 1 и 2 типов (Stx1/2) *EHEC* и *Shigella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК («ДНК-сорб-В», «РИБО-преп») или другие,

рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Таблица 1

Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиСенс® EHEC-FL»

Вид исследуемого материала	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ¹
Среда Кесслера	«ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³
Среда Кесслера	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов:

Esherichia coli – 31 штамм различных серогрупп (включая EHEC, EPEC, ETEC, EAaggEC, EIEC), *Cronobacter sakazakii* – 3 штамма; *Enterobacter cloacae* – 4 штамма; *Enterobacter aerogenes* – 2 штамма; *Pantoea agglomerans* – 2 штамма; *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus fetus*) – 8 штаммов; *Salmonella* spp. – 18 штаммов различных серогрупп; *Shigella* spp. – 12 штаммов различных видов и серогрупп; *Yersinia* spp. – 22 штамма различных видов и серогрупп; *Citrobacter freundii*; *Clostridium perfringens*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Protrus mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Serratia marcescens*.

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

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной

инструкции.

- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP/FRT-50 F – от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов). Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость для сброса наконечников.

При детекции «по конечной точке»:

10. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), MAXYGENE (Axygen, США), GeneAmp

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

При детекции в режиме «реального времени»:

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

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из среды для первичного обогащения исследуемого продукта питания, проведенного в соответствии с действующей нормативно-методической документацией.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Не требуется.

**ФОРМАТ FEP
СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для проведения амплификации ДНК генов шигоподобных токсинов 1 и 2 типов (Stx1/2) *EHEC* и *Shigella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FL <i>EHEC</i> / STI	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>E.coli</i> O:157 H:7 / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов;
- проведение амплификации;
- флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»;
- интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для экстракции ДНК из исследуемого образца («ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ

Эпидемиологии Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют стерильный образец среды для первичного обогащения. Перед применением среды для первичного обогащения рекомендуется тестирование ее стерильного образца на возможное содержание ДНК искомого микроорганизма.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно расчетной таблице (см. табл. 2). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок «Фон»). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов ДНК и пробирок «Фон». Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FL EHEC / STI**, **ПЦР-смесь-2-FRT** согласно табл. 2. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

**Схема приготовления реакционных смесей
для детекции по «конечной точке»**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ²	ПЦР-смесь-1-FL, мкл	ПЦР-смесь-2-FRT, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
8	80	40	3,0
10	100	50	4,0
12	120	60	5,0
14	140	70	6,0
16	160	80	7,0
18	180	90	8,0
20	200	100	9,0
22	220	110	10,0
24	240	120	11,0
26	260	130	12,0
28	280	140	13,0
30	300	150	14,0
32	320	160	15,0

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемой в реакционную смесь полимеразы (TaqF), указанное в табл. 2, приведено с учетом уже отобранных **30 мкл** реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

4. Приготовить 2 пробирки «Фон». Для этого внести по **15 мкл** приготовленной смеси (без полимеразы (TaqF)) в две пробирки «Фон», добавить по **10 мкл ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить **полимеразу (TaqF)** в количестве согласно табл. 2. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
6. Внести в оставшиеся пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей. Сверху раскапать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
7. Используя наконечники с фильтром, в пробирки с

² число исследуемых образцов, включая контроль этапа выделения ДНК (N), контроли этапа ПЦР и пробирки «Фон» с запасом на один образец (N+4+1).

реакционной смесью добавить по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

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

8. Поставить контрольные реакции амплификации:

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

б) положительный контроль (К+) - внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *E. coli* O:157 H:7 / ST1**;

в) контрольные образцы «Фон» (только для варианта FEP) - в приготовленные пробирки вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.

9. Подготовленные микропробирки «Фон», микропробирки с исследуемыми ДНК-образцами и контролями ПЦР готовы к проведению амплификации.

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

10. Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 3).

11. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Программа амплификации ДНК

цикл	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке) ³			Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке) ⁴			Амплификаторы с матричным регулированием температуры ⁵		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95°C	пауза		95°C	пауза		95°C	пауза	
1	95 °C	15 мин	1	95 °C	15 мин	1	95 °C	15 мин	1
2	95 °C	10 с	42	95 °C	10 с	42	95 °C	1 мин	42
	60 °C	10 с		60 °C	25 с		60 °C	1 мин	
	72 °C	10 с		72 °C	25 с		72 °C	1 мин	
3	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1
4	10 °C	хранение		10 °C	хранение		10 °C	хранение	

12. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

- по каналу для флуорофора **FAM** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО;
- по каналу для флуорофора **HEX** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК *ЕНЕС*.

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

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из исследуемых образцов.

³ GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»).

⁴ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research).

⁵ Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research).

Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 4.

Таблица 4

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Результат по уровню флуоресценции		Результат
Канал FAM	Канал HEX	
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК EHEC
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК EHEC
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Результат невалидный - проба требует повторного тестирования с этапа выделения ДНК
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения отрицательного результата и <u>ниже</u> порогового значения положительного результата	Результат сомнительный - проба требует повторного ПЦР-исследования

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с табл. 5.

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап	Сигнал по каналу	
		FAM	HEX
OK	Экстракция (выделение) ДНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
K+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналу для флуорофора HEX ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК EHEC.

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу для флуорофора HEX выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *ЕНЕС*, начиная с этапа экстракции (выделения) ДНК.
3. Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК – стерильный образец культуральной среды) могут быть связаны с загрязнением среды для первичного обогащения генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить исследование с этапа первичного обогащения с применением сред, не содержащих ДНК искомого микроорганизма, с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля выделения препарата ОКО.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для проведения амплификации ДНК генов шигиподобных токсинов 1 и 2 типов (Stx1/2) *EHEC* и *Shigella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL EHEC / STI	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>E. coli</i> O:157 H:7 / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов;
- проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для выделения ДНК из исследуемого образца («ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ

Эпидемиологии Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют стерильный образец среды для первичного обогащения. Перед применением среды для первичного обогащения рекомендуется тестирование ее стерильного образца на возможное содержание ДНК искомого микроорганизма.

Для оценки жизнеспособности микроорганизма рекомендуется проводить одновременное исследование в формате FRT двух образцов среды: образца, взятого после предписанной инкубации микроорганизма при оптимальной для его роста температуре и аналогичного образца, взятого непосредственно после посева материала и сохранявшегося до момента исследования при температуре минус 20 °С. Отставание сигнала по каналу JOE/Yellow/HEX в 3 и более пороговых цикла (C_t) для образца, сохранявшегося при температуре минус 20 °С свидетельствует о наличии в продукте жизнеспособного микроорганизма.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно расчетной таблице (см. табл. 6). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (K+) и отрицательного контроля (K-)). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с

- крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов ДНК. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
 3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FL ENEC / STI, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF)** в количестве, согласно табл. 6. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

Таблица 6

Схема приготовления реакционных смесей для детекции в режиме «реального времени»

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ⁶	ПЦР-смесь-1-FL, мкл	ПЦР-смесь-2-FRT, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
6	60	30	3,0
8	80	40	4,0
10	100	50	5,0
12	120	60	6,0
14	140	70	7,0
16	160	80	8,0
18	180	90	9,0
20	200	100	10,0
22	220	110	11,0
24	240	120	12,0
26	260	130	13,0
28	280	140	14,0
30	300	150	15,0
32	320	160	16,0

4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей.
5. Используя наконечники с фильтрами, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки

⁶ число исследуемых образцов, включая контроль этапа выделения ДНК (N), контроли этапа ПЦР с запасом на один образец (N+2+1).

реакционной смеси выбросить.

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

6. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) **отрицательный контроль (К–)** – внести в пробирки с реакционной смесью **10 мкл ДНК-буфера**;
 - б) **положительный контроль (К+)** - внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *E. coli* O:157 H:7 / ST1**.
7. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7).

Таблица 7

Программа амплификации

Цикл	Приборы роторного типа ⁷			Приборы планшетного типа ⁸		
	Температура, °С	Время	Число повторов циклов	Температура, °С	Время	Число повторов циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45	95	10 с	45
3	60	25 с детекция флуоресц. сигнала		60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	10 с	

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

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

⁷ например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные

⁸ например, iCycler iQ5, «ДТ-96» или аналогичные

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора **FAM** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО;
- по каналу для флуорофора **HEX** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК *ЕНЕС*.

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

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 8.

Таблица 8

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Результат по уровню флуоресценции		Результат
Канал FAM	Канал HEX	
Определено значение <i>Ct</i> более или менее граничного значения	Определено значение <i>Ct</i> менее граничного цикла	В пробе обнаружена ДНК <i>ЕНЕС</i>
Определено значение порогового цикла <i>Ct</i> меньше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	В пробе не обнаружена ДНК <i>ЕНЕС</i>
Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Результат невалидный - проба требует повторного тестирования с этапа выделения ДНК

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 9).

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу для флуорофора FAM/Green	по каналу для флуорофора JOE/Yellow/HEX
OK	Выделение (экстракция) ДНК	Определено значение меньше граничного ($Ct \leq \text{порог}$)	Значение отсутствует или больше граничного
K-	ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
K+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналу для флуорофора JOE/Yellow/HEX больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *EHEC*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу для флуорофора JOE/Yellow/HEX меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *EHEC*, начиная с этапа выделения (экстракции) ДНК.
3. Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (OK – стерильный образец культуральной среды) могут быть связаны с загрязнением среды для первичного обогащения генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить исследование с этапа первичного обогащения с применением сред, не содержащих ДНК искомого микроорганизма, с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля выделения препарата ОК0.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *EHEC* / STI, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *EHEC* / STI хранить в защищенном от света месте.


ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru)⁹.

⁹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Код партии		Максимальное число тестов
	Только для исследовательских и иных немедицинских целей		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Производитель		Дата изготовления

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
11.05.10	-	Добавлена фраза про анкету потребителя
28.07.11 LA	По тексту	Добавлен раздел «Символы, используемые в печатной продукции»
		Изменено название института на ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
		«Вариант FEP/FRT» исправлен на «формат FEP/FRT»
		Исправления по шаблону
	Форматы и формы выпуска набора реагентов	Добавлена форма 2 – комплектация наборов оптом
	Меры предосторожности	СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» исправлены на СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
		МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III–IV групп патогенности» исправлены на МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Добавлена фраза о хранении вскрытых реагентов
Добавлена ссылка об отзывах и предложениях		
Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»	
Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы	
01.10.11 LA	Титульная страница	Добавлены символ, наименование и адрес производителя
		Символ «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» перемещен в правый нижний угол страницы
		Удалена информация из нижнего колонтитула
30.01.12 LA	Титульная страница	Символ IVD , обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики» заменен на символ RUO «только для исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
11.10.12 IV	Назначение	Убраны ссылки на нормативные документы
	Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала	
03.10.14 PM	По тексту	Удалены приборы Mx3000P (Stratagene, США) и Mx3000
27.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	Для символа RUO изменена фраза с «Только для исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских целей»

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
03.02.15 BO	Назначение	Удалено: « ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной характеристике исследуемых образцов»
	Титульный лист Символы, используемые в печатной продукции	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
09.02.15 ME	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удален подраздел «Условия отпуска»
01.06.18 PM	Состав	Уточнен цвет реагента
12.02.19 PM	По тексту	Изменено форматирование текста
18.12.19 DV	Нижний колонтитул	Добавлен каталожный номер для формы 1 REF E-2931-3
11.02.20 VA	Гарантийные обязательства изготовителя	Раздел добавлен
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена информация о разуконплектации
07.04.20 EM	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Назначение	Добавлено уточнение о том, что НР не является медицинским изделием
26.11.20 MM	Список сокращений	Добавлена информация про фермент УДГ
	Принцип метода	