

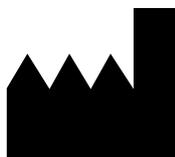
ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*) в продуктах питания методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Cronobacter sakazakii*-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	9
ФОРМАТ FEP	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	11
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ».....	14
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	14
ФОРМАТ FRT	17
СОСТАВ	17
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	17
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	18
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	20
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	24

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
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
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Cronobacter sakazakii*-FL» не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для проведения полимеразной цепной реакции с амплификацией ДНК *Cronobacter sakazakii* с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

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

Для выделения ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Cronobacter sakazakii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция ДНК из исследуемых образцов проводится в присутствии внутреннего контрольного

образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *Cronobacter sakazakii* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании 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 *Cronobacter sakazakii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» либо в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции (выделения) ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора («ДНК-сорб-В» или «РИБО-преп» или аналогичные).

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® *Cronobacter sakazakii*-FL»

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

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов:

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; *Escherichia coli* – 31 штамм различных серогрупп (включая *EHEC*, *EPEC*, *ETEC*, *EAggEC*, *EIEC*); *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.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», 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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями 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 – от 5 до 20 мкл и 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).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

При детекции «по конечной точке»:

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), MaxyGene (Axygen, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) или аналогичные).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, АЛА-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР

(плоская крышка, нестрипованные) на 0,2 или 0,5 мл:

- а) объемом 0,2 мл (например, «Ахуген», США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл (Gradient Palm Cycler, GeneAmp PCR System 2700, МахуGene 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»:

14. 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).
15. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Не требуется.

ФОРМАТ FEP**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Cronobacter sakazakii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>Cronobacter sakazakii</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Cronobacter sakazakii</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция (выделение) 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 клинического материала («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 *Cronobacter sakazakii* / STI, ПЦР-смесь-2-FRT** согласно табл. 2. Тщательно

перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

Таблица 2

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

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10.00	5.00	0.50
Число реакций ¹	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 раскатать 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 раскатать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).

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

7. Используя наконечники с фильтром, в пробирки с 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) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Cronobacter sakazakii* / STI**;

б) **отрицательный контроль (К-)** - внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;

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) ² :			Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке) ³ :			Амплификаторы с матричным регулированием температуры: ⁴		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	1 мин	42
	60 °С	10 с		60 °С	25 с		60 °С	1 мин	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	1 мин	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	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 – для флуорофоров FAM⁵, JOE⁵:

- 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 **JOE** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК *Cronobacter sakazakii*.

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

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно

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

³ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyler (Corbett Research).

⁴ Uno-2 (Biometra, MiniCycler, PTC-100 (MJ Research)).

⁵ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 4.

Таблица 4

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Результат по уровню флуоресценции		Результат
Канал для флуорофора FAM	Канал для флуорофора JOE	
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Cronobacter sakazakii</i>
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК <i>Cronobacter sakazakii</i>
<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-анализа

Контроль	Контролируемый этап	Сигнал по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
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 (К+) сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) сигнал по каналу для флуорофора JOE и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*, начиная с этапа выделения (экстракции) 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**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Cronobacter sakazakii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>Cronobacter sakazakii</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Cronobacter sakazakii</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция (выделение) 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 клинического материала («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 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 (К+) и отрицательного контроля (К-)). 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 *Cronobacter sakazakii* / STI**, **ПЦР-смесь-2-FRT**, **полимеразу (TaqF)** в количестве, согласно табл. 6. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

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

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10.00	5.00	0.50
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 реакционной смеси выбросить.
- ВНИМАНИЕ!** При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.
6. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Cronobacter sakazakii* / STI**;
 - б) **отрицательный контроль (К-)** - внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 7. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения

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

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
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала		60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
		72				

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM⁹ и JOE⁹ (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.

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 **JOE** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК *Cronobacter*

⁷ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные.

⁸ Например, iCycler iQ5, «ДТ-96» или аналогичные.

⁹ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

sakazakii.

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 для флуорофора FAM	Канал для флуорофора JOE	
Определено значение Ct более или менее граничного значения	Определено значение Ct менее граничного цикла	В пробе обнаружена ДНК <i>Cronobacter sakazakii</i>
Определено значение порогового цикла Ct меньше граничного	Значение Ct отсутствует или больше граничного	В пробе не обнаружена ДНК <i>Cronobacter sakazakii</i>
Значение Ct отсутствует или больше граничного	Значение Ct 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).

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа.

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Значение порогового цикла, Ct	
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE
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 (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) сигнал по каналу флуорофора JOE и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*, начиная с этапа выделения (экстракции) 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.

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

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.ru¹⁰.

¹⁰ 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		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Только для исследовательских и иных немедицинских целей		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
11.05.10	-	Добавлена фраза про анкету потребителя
09.07.10	Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	Исправлено название реагента
26.10.10	Состав	Удалены фразы «по конечной точке» из варианта FEP и «в режиме реального времени» из варианта FRT, расставлены пробелы до и после / в необходимых случаях
17.12.10 RT	Вариант FEP, интерпретация результатов	Исправлены каналы для флуорофоров для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и отрицательного контроля ПЦР (K-)
	Вариант FRT, анализ и интерпретация результатов	Исправлены пункты для положительного контроля ПЦР (K+), отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и отрицательного контроля ПЦР (K-)
25.07.11 VV	Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»
	Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы
	Меры предосторожности	СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» заменен 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» заменены на МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности»
	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 комплектации 2 – комплектация наборов оптом
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Добавлена фраза о хранении вскрытых реагентов
Удален адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора		
Добавлена ссылка об отзывах и предложениях		
30.09.11 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

27.01.12 VV	Титульная страница, Символы, используемые в печатной продукции	символ IVD , обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики» заменен на символ RUO «только для исследовательских целей»
11.10.12 MI	Назначение	Убраны ссылки на нормативные документы
	Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала	
25.06.13 ME	Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»	Добавлена ссылка «Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов»
	Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалено «Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений»
	Символы, используемые в печатной продукции	Удален символ  «Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации»
	По тексту	Названия каналов указаны как каналы для флуорофоров
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»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
03.02.15 BO	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
17.03.15 PM	Назначение	Удалена фраза « ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной характеристике исследуемых образцов.»
02.04.19 EM	—	Изменено форматирование текста
16.12.19 VA	Нижний колонтитул	Добавлен каталожный номер REF E-2911-3
06.02.20 VA	Гарантийные обязательства изготовителя	Раздел добавлен

	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена информация о разуконплектации набора реагентов
08.04.20 VA	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Назначение	Добавлена фраза «не является медицинским изделием»
25.11.20 KK	Список сокращений	Добавлена информация про фермент УДГ
	Принцип метода	