

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 27.05.2010 №
4287-ПР/10

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«29» _____ 2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Salmonella typhi*

в объектах окружающей среды и клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс[®] *Salmonella typhi*-FL»

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	8
ВАРИАНТ FEP	9
СОСТАВ	9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	9
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	10
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	13
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	13
ВАРИАНТ FRT	16
СОСТАВ	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	17
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль этапа экстракции ДНК/РНК
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
кДНК	- комплементарная ДНК
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное 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® *Salmonella typhi*-FL»** предназначен для выявления ДНК *Salmonella typhi* (детекция проводится по генам Vi-антигена и первой фазе жгутикового H-антигена d (H1-фаза d жгутикового антигена), *Salmonella spp.*), что позволяет дифференцировать *S.typhi* от имеющих Vi-антиген *S.paratyphi C*, *S.dublin* и имеющих H1-фазу d жгутикового антигена *S.stanley*, *S.isangi*, *S.muenchen*, *S.gaminara*, *S.utrecht*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора («ДНК-сорб- В», «РИБО-сорб» или «РИБО-преп»).

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Salmonella typhi* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию (выделение) ДНК из образцов исследуемого материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция ДНК из клинического 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 возбудителя 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 варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте

Вариант FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения реакции амплификации ДНК *Salmonella typhi* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Патоген	Вид клинического материала	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
<i>S.typhi</i>	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³ ГЭ/мл
<i>S.typhi</i>	фекалии	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³ ГЭ/мл

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов:

Штаммы из коллекции ФГУ ВГНКИ: *Salmonella enteritidis* S-6, *Salmonella choleraesuis* 370, *Salmonella typhimurium* 371, *Salmonella dublin* 373, *Salmonella typhi* C1, *Salmonella abortusovis* 372, *Salmonella gallinarum-pullorum*, *Shigella flexneri* 851b, *Campylobacter fetus subsp. fetus* 25936, *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* 43435, *Klebsiella K 65 SW4*, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 19, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 52, *Proteus vulgaris* 115/98, *Pseudomonas aeruginosa* ДН с1, *Staphylococcus aureus* 653, *Staphylococcus aureus* 29112, *Morganella Morganii* 619 с 01, *Enterococcus faecalis* 356.

Штаммы *Salmonella typhi* (18 штаммов) различных фаготипов.

Штаммы *Yersinia enterocolitica* (14 штаммов) и *Yersinia pseudotuberculosis* (12 штаммов) из собрания ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

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», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и

методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать образцы как потенциально вызывающие инфекцию и хранить в биологическом кабинете 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».
- Уничтожать образцы и неиспользованные реактивы в соответствии с СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

ВНИМАНИЕ! При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации 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.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Лист безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ 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, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
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), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) или аналогичные).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (с плоской крышкой, нестрипованные):
 - а) объемом 0,2 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл (Gradient Palm Cyclor, 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), iQ5 (Bio-Rad, США), Мх3000Р (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:

- а) на 0,2 мл (с плоской крышкой, нестрипованные; например, Ахуген, США) для постановки в ротор на 36 пробирок – к приборам для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene).
- б) на 0,2 мл (с куполообразной крышкой; например, Ахуген, США) – к приборам для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, iQ5, Mx3000P).

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 исследования служат образцы фекалий и концентраты образцов воды, подготовленные в соответствии с МУК 4.2.2029-05 «Методические указания по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов».

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Концентраты образцов воды не требуют специальной подготовки для экстракции ДНК. Подготовка образцов фекалий проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ВАРИАНТ FEP**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции амплификации ДНК *Salmonella typhi* – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>S.typhi</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
ПКО ДНК <i>S.typhi</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения ДНК:

<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 (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация ДНК.
- 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-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо 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 реагентов 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-FEP/FRT *S.typhi* / STI** и **ПЦР-смесь-2-FRT** согласно табл. 1. Тщательно перемешать полученную смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

4. Приготовить 2 пробирки «Фон». Для этого внести по **15 мкл** приготовленных смесей (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, указанном в табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией по «конечной точке»

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	10.00	5.00	0.50
Число реакций ¹	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
6	60	30	2.0
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
34	340	170	16.0

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемого в реакционную смесь фермента полимеразы (TaqF), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон» (с вычетом двух пробирок «Фон»).

6. Внести в оставшиеся пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей. Сверху раскатать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно **25 мкл**).
7. Используя наконечники с аэрозольными барьерами, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб

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

этапа выделения нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» или «РИБО-сорб», 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 пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *S. typhi* / STI**.

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

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей. Запуск реакции на приборе должен произойти не позже, чем через 10-15 минут с момента внесения проб в реакционную смесь.

9. Запустить на амплификаторе программу амплификации (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации ДНК

цикл	Амплификаторы с активным регулированием температуры (по раствору в пробирке):						Амплификаторы с матричным регулированием температуры:		
	GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyler (Corbett Research)			Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research)		
	темпера-тура	время	кол-во циклов	темпера-тура	время	кол-во циклов	темпера-тура	время	кол-во циклов
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	

10. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ
АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»**

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

Таблица 3

**Схема соответствия тестируемых патогенов
и каналов флуоресцентной детекции**

Канал детекции	ПЦР-смесь-1- FEP/FRT <i>S.typhi</i> / STI
FAM	ДНК ВКО-FL
HEX	ДНК гена Vi-антигена
ROX	ДНК H1-фазы d жгутикового антигена

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к набору реагентов «АмплиСенс® *Salmonella typhi*-FL».

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 клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 4.

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Уровень флуоресценции			Результат
	Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>S. typhi</i> / STI	Выше порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК <i>S.typhi</i>
	<u>Выше или Ниже</u> порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>S.typhi</i>
	<u>Выше или Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>S.stanley</i> , <i>S.isangi</i> , <i>S.muenchen</i> , <i>S.gaminara</i> , <i>S.utrecht</i> (или других сероваров сальмонелл, имеющие H1-фазу d жгутикового антигена)
	<u>Выше или Ниже</u> порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена ДНК <i>S.paratyphi C</i> или <i>S.dublin</i>
	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Результат невалидный - проба требует повторной экстракции и амплификации

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, он расценивается как **сомнительный** и требует повторения ПЦР-исследования соответствующего исследуемого образца.

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.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап	Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>S.typhi</i> / STI	OK	Экстракция ДНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	К-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	К+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительно го результата	<u>Выше</u> порогового значения положительно го результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам HEX, FAM или ROX ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналам HEX, FAM или ROX был ниже порогового значения положительного результата.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) (кроме канала FAM) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) (по всем каналам) сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа выделения (экстракции) ДНК.

ВАРИАНТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции амплификации ДНК *Salmonella typhi* – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>S.typhi</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
ПКО ДНК <i>S.typhi</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения ДНК:

<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 (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 экстракции ДНК из клинического материала («ДНК-сорб-В», «РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого

клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

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. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. таблицу 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-) для каждого типа смеси)**. 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-FEP/FRT *S.typhi* / STI**, **ПЦР-смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в таблице 6. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей.

**Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР
с детекцией в режиме «реального времени»**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	10.00	5.00	0.50
Число реакций ²	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
4	40	20	2.0
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

5. Используя наконечники с аэрозольными барьерами, 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» и «РИБО-сорб», 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 пробирки **10 мкл ПКО ДНК *S. typhi* / STI**.

7. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

² Число клинических образцов, контроли этапа выделения ДНК (N), контроли этапа ПЦР с запасом на один образец (N+2+1).

Программа амплификации

Цикл	Приборы роторного типа ³			Приборы планшетного типа ⁴		
	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, JOE и ROX (при одновременном проведении нескольких 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 трем каналам: FAM/Green, JOE/Yellow/HEX и ROX/Orange.

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 и вкладываем к набору реагентов «АмплиСенс® *Salmonella typhi-FL*».

³ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные.

⁴ Например, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» или аналогичные.

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Значение порогового цикла			Результат
	Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>S.typhi</i> / STI	<u>Меньше</u> граничного значения	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	В пробе не выявлена ДНК <i>S.typhi</i>
	<u>Больше или меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	В пробе выявлена ДНК <i>S.typhi</i>
	<u>Больше или меньше</u> граничного значения	<u>Больше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	В пробе выявлена ДНК <i>S.stanley</i> , <i>S.isangi</i> , <i>S.muenchen</i> , <i>S.gaminara</i> , <i>S.utrecht</i> (или других сероваров сальмонелл, имеющие H1-фазу d жгутикового антигена)
	<u>Больше или меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Больше</u> граничного значения	В пробе выявлена ДНК <i>S.paratyphi C</i> или <i>S.dublin</i>
	<u>Больше</u> граничного значения	<u>Больше</u> граничного значения	<u>Больше</u> граничного значения	Результат невалидный - проба требует повторной экстракции и амплификации

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 экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 9).

Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап	Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX
ПЦР-смесь-1- FEP/FRT <i>S.typhi</i> / STI	OK	Экстракция ДНК	<u>Меньше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения
	К-	ПЦР	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения
	К+	ПЦР	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам HEX, FAM или ROX отсутствует или больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *S typhi*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) (кроме канала FAM) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) (по всем каналам) сигнал меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа выделения (экстракции) ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

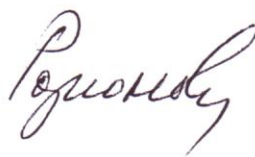
Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С (кроме ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *S.typhi* / STI, ПЦР-смеси-2-FRT, полимеразы (TaqF)). ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *S.typhi* / STI, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Salmonella typhi-FL*» направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru, и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс®» можно оставить, заполнив анкету потребителя на сайте www.amplisens.ru.

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний



Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора