

1041-2 2026-02-03



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления ДНК
термофильных кампилобактерий *Campylobacter coli* и
Campylobacter jejuni (без дифференциации), бактерий рода *Shigella* и
энтероинвазивных *E.coli* (EIEC) (без дифференциации), бактерий рода *Salmonella* spp. и
патогенных штаммов *Yersinia enterocolitica*
методом ПЦР в режиме реального времени

БакСкрин ОКИ 2

Регистрационный номер
РЗН 2025/25516 (ЕРУЛ - Г004-00110-00/02938839) от 31.01 2026

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
2.1	Состав набора реагентов.....	5
2.2	Количество анализируемых образцов.....	6
2.3	Принцип метода	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
3.1	Аналитическая специфичность	8
3.2	Интерферирующие вещества	9
3.3	Предел обнаружения	10
3.4	Диагностические характеристики.....	10
3.5	Воспроизводимость и повторяемость	10
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	13
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	16
6.1	Материал для исследования	16
6.2	Общие требования	16
6.3	Взятие материала на исследование	16
6.4	Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	17
6.5	Подготовка биологического материала для выделения ДНК	17
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	19
7.1	Выделение ДНК из биологического материала	19
7.2	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	19
7.3	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	22
7.4	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	26
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	27
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	28
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	30
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	31
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	31
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	31
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	32
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	33
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	34
	Приложение А.....	35
	Приложение Б.....	36
	Приложение В.....	37

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

EIEC	- от англ. Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)
ОБМ	- общая бактериальная масса
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РНКазаы	- рибонуклеазы

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК термофильных кампилобактерий *Campylobacter coli* и *Campylobacter jejuni* (без дифференциации), бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli* (EIEC) (без дифференциации), бактерий рода *Salmonella* spp. и патогенных штаммов *Yersinia enterocolitica* методом ПЦР в режиме реального времени (БакСкрин ОКИ 2), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК термофильных кампилобактерий *Campylobacter coli* и *Campylobacter jejuni* (без дифференциации), бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli* (EIEC) (без дифференциации), бактерий рода *Salmonella* spp. и патогенных штаммов *Yersinia enterocolitica* в биологическом материале человека (фекалии) и бактериальных культурах, полученных из этого биоматериала, методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*, скрининг.

1.4 Показания к проведению исследования:

- симптомы инфекционных заболеваний, вызванных возбудителями острых кишечных инфекций, и эпидемиологически связанные случаи;
- скрининг бессимптомного носительства *Campylobacter coli/jejuni*, *Shigella*/EIEC, *Salmonella* spp. и *Yersinia enterocolitica*.

Противопоказаний к применению нет.

1.5 Популяционные и демографические аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6 Область применения: набор реагентов может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории: врач клиничко-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник).

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P507-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-P507-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-P507-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

Комплектность:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.
- Инструкция по применению – 1 экз.
- Вкладыш – 1 экз.
- Паспорт – 1 экз.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений (не более 24 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке U рассчитан на проведение 96 определений при условии постановки не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени, качественный мультиплексный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для фасовки S методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах. «Горячий» старт для фасовки U обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С. Это исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах.

В состав смеси для амплификации входит смесь для определения общей бактериальной массы (ОБМ). Значение ОБМ необходимо как контроль взятия материала для исследования, а также для анализа качества выделения ДНК из образцов биологического материала и позволяет определить, достаточно ли полученного количества ДНК для проведения анализа.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических продуктов амплификации. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов определяемых бактерий, включены флуоресцентные метки Fam, Hex, Rox и Cy5.5. В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации общей бактериальной массы (ОБМ), входит флуоресцентный краситель Cy5.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella/EIEC</i>	ОБМ*	<i>Yersinia enterocolitica</i>
* – контрольный показатель				

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов БакСкрин ОКИ 2.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих ДНК выявляемых аналитов, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительный результат амплификации специфических продуктов по заявленным каналам детекции¹.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемых аналитов, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфических продуктов по заявленным каналам детекции² и положительный результат амплификации для общей бактериальной массы (ОБМ)³ по каналу детекции Су5.

При наличии в образцах ДНК заявленных возбудителей острых кишечных инфекций наблюдались специфические положительные результаты амплификации. Референтные штаммы были получены из Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи и коллекции ГKB № 67 им. Л.А. Ворохобова.

Подтверждение аналитической специфичности набора реагентов проводилось на образцах ДНК из культур заявленных микроорганизмов, а также ДНК из культур близкородственных или потенциально присутствующих в биологическом образце в высокой концентрации ($1,0 \times 10^{10}$ КОЭ/мл) микроорганизмов: *Akkermansia muciniphila*, *Alistipes finegoldii*, *Allisonella histaminiformans*, *Anaerococcus* spp., *Astrovirus*, *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bilophila wadsworthia*, *Blautia coccoides*, *Butyricimonas virosa*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Candida albicans*, *Clostridioides difficile*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium symbiosum*, *Collinsella aerofaciens*, *Coprobacter fastidiosus*, *Coprococcus comes*, *Desulfovibrio piger*, *Dialister* spp., *Dorea* spp., *Eggerthella lenta*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterovirus*, *Escherichia coli* K12, *Eubacterium limosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Megasphaera cerevisiae*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Neisseria flava*, *Norovirus*, *Parabacteroides merdae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella copri*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rotavirus*, *Ruminococcus* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella* spp., *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Slackia piriformis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, энтероинвазивные *Escherichia coli* (EIEC) и/или ДНК человека в концентрации до $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца.

¹ – интерпретация результатов амплификации ДНК выявляемых аналитов приведена в таблицах 6, 7

² – для *Salmonella* spp. допускается значение Cp/Cq > 39 по каналу детекции Hex

³ – положительным результатом амплификации для ОБМ считается значение Cp/Cq ≤ 35 по каналу детекции Су5

Наблюдалось отсутствие перекрестных неспецифических реакций каждого компонента, входящего в состав набора, по отношению к другой мишени системы. Отсутствовали неспецифические положительные результаты амплификации при наличии в образцах ДНК других микроорганизмов, потенциально присутствующих в образце биоматериала, а также ДНК человека в концентрации до $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых/недоверенных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации ОБМ и специфического продукта (см. 2.3, 9.4).

К ингибиторам ПЦР отнесены следующие вещества: гемоглобин, билирубин, холестерин, триглицериды, слизь (муцин) и лекарственные препараты, оставшиеся в образце ДНК в результате неполного их удаления в процессе выделения ДНК из образца биоматериала, а также изопропиловый спирт и метилацетат, которые могут присутствовать в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в таблице ниже.

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Концентрация интерферирующих веществ
<i>Эндогенные вещества</i>		
Фекалии	Билирубин	684 мкмоль/л
	Холестерин	13 ммоль/л
	Гемоглобин	0,35 мг/мл
	Триглицериды	37 ммоль/л
	Муцин	20%
<i>Экзогенные вещества</i>		
Фекалии	Изопропиловый спирт	10%
	Метилацетат	10%
	Ибупрофен суппозитории	5,0%
	Эспумизан эмульсия	5,0%
	Виферон суппозитории	10%

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как слизь, кровь, местные лекарственные препараты, в том числе содержащиеся в ректальных свечах, удаляются в ходе выделения НК с использованием наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала.

3.3 Предел обнаружения

Пределы обнаружения микроорганизмов, выявляемых с помощью набора реагентов БакСкрин ОКИ 2, установлены путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО) и представлены в таблице ниже.

Предел обнаружения соответствует следующим значениям концентрации ДНК при использовании указанных наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК:

Выявляемый показатель	Копий/амплификационную пробирку	Копий/мл препарата ДНК	Копий/мл биологического материала (фекальной суспензии)				
			ПРОБА-НК	ПРОБА-ГС	ПРОБА-ГС-ПЛЮС	ПРОБА-ОПТИМА	ПРОБА-МЧ МАКС, ПРОБА-НК-ПЛЮС (объем элюции 300 мкл)
<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	10	2,0x10 ³	1,0x10 ³	4,0x10 ³	1,2x10 ⁴	1,8x10 ⁴	6,0x10 ³
<i>Salmonella</i> spp.	10	2,0x10 ³	1,0x10 ³	4,0x10 ³	1,2x10 ⁴	1,8x10 ⁴	6,0x10 ³
<i>Shigella</i> /EIEC	10	2,0x10 ³	1,0x10 ³	4,0x10 ³	1,2x10 ⁴	1,8x10 ⁴	6,0x10 ³
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10	2,0x10 ³	1,0x10 ³	4,0x10 ³	1,2x10 ⁴	1,8x10 ⁴	6,0x10 ³

3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Аналит	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Фекалии	<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)
	<i>Shigella</i> /EIEC	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)
	<i>Salmonella</i> spp.	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Бактериальные культуры	<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)
	<i>Shigella</i> /EIEC	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)
	<i>Salmonella</i> spp.	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Итого		100% (95% ДИ: 98,78% – 100%)	100% (95% ДИ: 98,78% – 100%)

3.5 Воспроизводимость и повторяемость

Воспроизводимость составляет 100%.

Повторяемость составляет 100%.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 15190-2023, 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», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится выделение НК и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента		Указание на риски
	Фасовка S	Фасовка U	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	–	–
Раствор Таq-полимеразы	Нет опасных веществ	–	–
Минеральное масло	Нет опасных веществ	–	–
Смесь для амплификации	–	Нет опасных веществ	–
Полимераза ТехноТаq МАХ	–	Нет опасных веществ	–
ПЦР-буфер	–	Нет опасных веществ	–
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	да	да ²
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да	да ³	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да	да
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или микропланшет ПЦР 96 лунок ⁴	нет	нет	да	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да	да
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12М1 или 15М1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстрим	нет	нет	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *М1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	нет	нет	да
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	нет	да ⁵	да
центрифуга с RCF(g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	нет	да ⁵	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов	нет	нет	да ⁵	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный				

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное
набор/комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала ⁶ , рекомендуются: – Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС по ТУ 21.20.23-106-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14391; – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009, в формах комплектации: комплект ПРОБА-НК, комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; – Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в формах комплектации: ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08696; – Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА) по ТУ 21.20.23-124-46482062-2021, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496.				
Дополнительно для подготовки фекалий:				
бокс биологической безопасности II класса				
центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF(g) не ниже 13000				
дезинфицирующий раствор				
глицерин (при необходимости)				
Примечания к таблице:				
¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже ² – валидирован детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм» 5X*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 ³ – только при использовании пробирок ⁴ – не используется для детектирующего амплификатора «ДТлайт» ⁵ – только при использовании микропланшетов ⁶ – возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала (7.1)				

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного и роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объемом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °С.

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм 5M*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация

«ДТпрайм 5X*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования), далее по тексту – «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм 5X*»;

– Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт 5S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228 (только для набора реагентов в фасовке S; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок), далее по тексту – «ДТлайт»;

– Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96), Био-Рад Лабораториз, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399, далее по тексту – CFX96.

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют биологический материал человека (фекалии) и бактериальные культуры, полученные из этого биоматериала.

6.2 Общие требования

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

На этапе подготовки биоматериала используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будете вносить биологический материал, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК может потребоваться подготовка образцов биологического материала (6.5).

6.3.1 Фекалии

Ограничение метода¹: исследование рекомендовано проводить не ранее, чем через два дня после окончания приёма энтеросорбентов.

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС:

Для анализа используют образцы фекалий массой (объемом) примерно 1,0–3,0 г (1,0–3,0 мл). Взятие материала проводится отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками в специальный стерильный сухой флакон в количестве примерно 1,0 г.

После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплексам реагентов для выделения НК

6.3.2 Бактериальные культуры

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС:

Взятие материала с жидких и плотных питательных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя.

Подготовьте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объёмом 1,5–2,0 мл с 500 мкл стерильного физиологического раствора. Поместите в каждую пробирку одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды. Плотно закройте и промаркируйте пробирку.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала определяются инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

Допускается транспортировать и хранить¹:

Образцы нативных фекалий:

- при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 3 суток.

Фекальную суспензию с глицерином:

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Бактериальные культуры:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 20 °С до минус 18 °С – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

6.5 Подготовка биологического материала для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС:

6.5.1 Фекалии

6.5.1.1 Подготовьте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с 1,0 мл стерильного физиологического раствора.

6.5.1.2 Поместите в каждую пробирку примерно 0,1–0,2 г (мл) фекалий.

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектам реагентов для выделения НК

6.5.1.3 Тщательно ресуспендируйте содержимое пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 5–10 с.

Примечание – При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к суспензии фекалий в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида добавляют глицерин в конечной концентрации 10–15%. Подготовленные таким образом образцы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30–40 минут.

6.5.1.4 Центрифугируйте пробирки с образцами суспензий фекалий при RCF(g) 13000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 30 с для осаждения дебриса на дно пробирки.

6.5.1.5 Промаркируйте по одной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К–».

6.5.1.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки среднюю фракцию из пробирок с суспензиями фекалий. Для этого отберите из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром бактериальную фракцию (верхняя бело-жёлтая часть образовавшегося осадка) в объёме 100 мкл (для комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС или набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС) или 50 мкл (для комплектов реагентов ПРОБА-ГС или ПРОБА-ГС-ПЛЮС). При отсутствии бело-жёлтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отберите 100 или 50 мкл с границы осадка и супернатанта, допускается частичный захват дебриса.

6.5.1.7 Внесите в пробирку «К–» 100 мкл или 50 мкл отрицательного контрольного образца, согласно инструкции по применению используемого набора/комплекта реагентов для выделения ДНК.

Образцы готовы для выделения ДНК.

6.5.2 Бактериальные культуры

Тщательно ресуспендируйте содержимое пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 5–10 с, центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с. Для выделения ДНК используется 100 мкл образца (для комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС) или 50 мкл образца (для комплектов реагентов ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС).

Образцы готовы для выделения ДНК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения на медицинское изделие и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛУС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛУС, ПРОБА-ОПТИМА, ПРОБА-МЧ МАКС (таблица 2).

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией по применению используемого набора/комплекта реагентов.

Таблица 2 – Наборы/комплекты реагентов, валидированные для выделения ДНК для дальнейшего исследования с использованием набора реагентов БакСкрин ОКИ 2

Набор/комплект реагентов, РУ	Биоматериал	Минимальное количество элюата, мкл
Комплект реагентов ПРОБА-НК, РУ № ФСР 2010/08867, в т.ч. сокращенная методика в соответствии с Приложением В	Фекалии, бактериальные культуры	50
Комплект реагентов ПРОБА-НК-ПЛУС, РУ № ФСР 2010/08867, в т.ч. сокращенная методика в соответствии с Приложением В	Фекалии, бактериальные культуры	300
Комплект реагентов ПРОБА-ГС, РУ № ФСР 2010/08696	Фекалии, бактериальные культуры	100
Комплект реагентов ПРОБА-ГС-ПЛУС, РУ № ФСР 2010/08696	Фекалии, бактериальные культуры	300
Набор реагентов ПРОБА-ОПТИМА, РУ № РЗН 2022/17496	Фекалии, бактериальные культуры	400
Набор реагентов ПРОБА-МЧ МАКС, РУ № РЗН 2021/14391	Фекалии	300

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 24 постановки при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать два неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать две пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 4.

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.2.3 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

7.2.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте пробирки/стрипы крышками.

7.2.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки), необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Необходимо закрывать пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.9 Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.2.10 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора.

7.2.11 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

7.2.12 Для детектирующих амплификаторов CFX96:

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 4.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка S)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96 (фасовки S, U)

№ блока (Step)	Температура, °С	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	00:15	50
4	64 √	00:20	

√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5) при 64 °С

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объемом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок², герметизируемые термоплёнкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постаmplификационной контаминации.

2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых амплификационных пробирок объемом 0,2 мл или микропланшет 96 лунок для неизвестных образцов, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

² – для детектирующего амплификатора «ДТлайт» микропланшеты 96 лунок не используются

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки/зарезервировать 4 лунки микропланшета для неизвестных образцов, одну пробирку/лунку для «К-» и одну пробирку/лунку для «К+». Общее количество пробирок/лунок – 6.

7.3.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.3.3 Внесите во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета (включая «К-» и «К+») по 6,0 мкл смеси для амплификации.

7.3.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТақ МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТақ МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ МАХ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 6,0 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,3 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТақ МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К-», «К+».

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца, «К-», «К+». Промаркированных пробирок/необходимых лунок микропланшета – 6. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ для 7 (6+1) пробирок/лунок, т.е. 42 мкл ПЦР-буфера + 2,1 мкл полимеразы ТехноТақ МАХ.

7.3.6 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.3.7 Добавьте во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ. Неплотно закройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ в пробирки/лунки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 7.3.8 – 7.3.14.

7.3.8 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Необходимо закрывать пробирки плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.3.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К–» и «К+», ДНК не вносится.

7.3.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К–», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.7.1).

7.3.11 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К+», 6,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.12 В случае использования микропланшетов 96 лунок:

7.3.12.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.3.12.2 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.3.12.3 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.3.13 В случае использования пробирок:

Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.14 Установите все пробирки/микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР (7.3.15, 7.3.16).

7.3.15 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.3.14) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 5.

7.3.16 Для детектирующих амплификаторов CFX96:

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 4.

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка U)

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ²	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

² – допускается хранение при температуре 10 °C

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм 5X*»)

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать микропланшеты ПЦР 384 лунки, герметизируемые термоплёнкой.
2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

7.4.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, приготовьте в отдельной одноразовой пробирке смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ.

7.4.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением дозирования для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения

надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

- 7.4.6 Установите пробирки со смесью для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ, с препаратами ДНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.
- 7.4.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.
- 7.4.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.
- 7.4.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.4.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 5.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учёт результатов амплификации осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Setting» необходимо выбрать «Baseline Subtracted Curve Fit».

9.3 Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицами 6, 7. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 6 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции					Интерпретация результата
Fam, Cp/Cq	Hex, Cp/Cq	Rox, Cp/Cq	Cy5, Cp/Cq	Cy5.5, Cp/Cq	
Неизвестные образцы					
< 37	> 39 или не указан	Не указан	Не учитывается	Не указан	Обнаружена ДНК <i>Campylobacter coli/jejuni</i>
Не указан	< 37	Не указан	Не учитывается	Не указан	Обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i>
Не указан	> 39 или не указан	< 37	Не учитывается	Не указан	Обнаружена ДНК <i>Shigella/EIEC</i>
Не указан	> 39 или не указан	Не указан	Не учитывается	< 37	Обнаружена ДНК <i>Yersinia enterocolitica</i>
Не указан	> 39 или не указан	Не указан	≤ 35	Не указан	Не обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов
≥ 37 или не указан	> 39 или не указан	≥ 37 или не указан	> 35 или не указан	≥ 37 или не указан	Недостовверный результат ¹
Отрицательный контрольный образец					
Не указан	> 39 или не указан	Не указан	> 35 или не указан	Не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец					
Указан	Указан	Указан	Указан	Указан	Положительный результат Результаты постановки валидны

¹ – требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие биологического материала у пациента (выполняется последовательно)

Таблица 7 – Другие возможные результаты ПЦР

Канал детекции					Интерпретация результата*
Fam, Cp/Cq	Hex, Cp/Cq	Rox, Cp/Cq	Cy5, Cp/Cq	Cy5.5, Cp/Cq	
Неизвестные образцы					
≥ 37	> 39 или не указан	Не указан	≤ 35	Не указан	Низкое содержание ДНК <i>Campylobacter coli/jejuni</i>
Не указан	≥ 37, но ≤ 39	Не указан	≤ 35	Не указан	Низкое содержание ДНК <i>Salmonella spp.</i>
Не указан	> 39 или не указан	≥ 37	≤ 35	Не указан	Низкое содержание ДНК <i>Shigella/EIEC</i>
Не указан	> 39 или не указан	Не указан	≤ 35	≥ 37	Низкое содержание ДНК <i>Yersinia enterocolitica</i>

* – если при значении Cp/Cq по каналу детекции Cy5 ≤ 35, по каналу детекции Hex значение Cp/Cq ≥ 37, но ≤ 39 и/или по каналам детекции Fam, и/или Rox, и/или Cy5.5 значение Cp/Cq ≥ 37, то полученный результат указывает на низкое содержание специфической ДНК, которое может быть связано с низкой нагрузкой в неизвестном образце, с перекрёстной контаминацией высококопийными образцами или с ингибированием ПЦР. Следует **однократно** провести повторное взятие биоматериала и/или повторное выделение ДНК и проведение ПЦР. В случае повторения результата, следует выдать итоговый результат «Обнаружена ДНК...»

9.4 При анализе результатов необходимо учитывать значение общей бактериальной массы (ОБМ, канал детекции Cy5):

Значение Cp/Cq ОБМ > 35 при отсутствии специфических положительных результатов в пробирке следует интерпретировать как недостаточное количество материала или возможное ингибирование ПЦР. Результат амплификации – «нд».

9.5 В образцах биологического материала, содержащих ДНК выявляемых аналитов, во время проведения амплификации программное обеспечение регистрирует положительный результат по соответствующему каналу детекции (Fam, Hex, Rox или Cy5.5). Интерпретация результата – «обнаружено» («+»).

9.6 В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемых аналитов, при проведении амплификации программное обеспечение будет регистрировать отрицательный результат по соответствующему каналу детекции (Fam, Hex, Rox или Cy5.5) в пробирке. Интерпретация результата – «не обнаружено» («-»).

9.7 При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 6, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

9.8 При получении для положительного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Фасовка S

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Фасовка U

10.1.3.1 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТақ МАХ, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТақ МАХ в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Фасовка S

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2 Фасовка U

10.2.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТақ МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2.2 Полимеразу ТехноТақ МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

- 10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.
- 10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
- все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
 - смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
 - полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ












12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействия солнечного света
	Нестерильно

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

ГОСТ Р ИСО 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г.о. Серпухов, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8(800) 200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru,

www.dna-technology.ru

Приложение А

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов БакСкрин ОКИ 2
в фасовке S**

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объём реакционной смеси – 35 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella/EIEC</i>	ОБМ	<i>Yersinia enterocolitica</i>

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

Приложение Б

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов БакСкрин ОКИ 2
в фасовке U**

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объем реакционной смеси – 18 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella/EIEC</i>	ОБМ	<i>Yersinia enterocolitica</i>

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

Приложение В

Сокращённая методика выделения ДНК из фекалий и бактериальных культур с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС**ВНИМАНИЕ!**

1. Перед началом работы необходимо:

- включить термостат для прогрева до 65 °С;
- достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка необходимо прогреть флакон с лизирующим раствором на термостате, предварительно прогревом до 65 °С, до полного растворения осадка. Затем следует перемешать раствор переворачиванием флакона вверх дном 5–10 раз, избегая пенообразования. Перед использованием охладите раствор до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С). Осадок также можно растворить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение приблизительно 12 часов.

2. При прогревании пробирок с образцами возможно открывание крышек! Следует использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

- 1.** Промаркируйте по одной одноразовой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого неизвестного образца и для отрицательного контрольного образца (К-).
- 2.** Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
- 3.** Центрифугируйте пробирки с образцами суспензий фекалий при RCF(g) 13000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 30 с для осаждения дебриса на дно пробирки. Внесите в соответствующие промаркированные пробирки среднюю фракцию из пробирок с суспензиями фекалий. Для этого отберите из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром бактериальную фракцию (верхняя бело-жёлтая часть образовавшегося осадка) в объёме 100 мкл. При отсутствии бело-жёлтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отберите 100 мкл с границы осадка и супернатанта, допускается частичный захват дебриса.
Если материал для выделения ДНК – бактериальная суспензия, то внесите в соответствующие промаркированные пробирки по 100 мкл образцов.
- 4.** Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца. Плотнo закройте пробирки, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3–5 с.
- 5.** Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
- 6.** Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3–5 с.
- 7.** Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3–5 с.

8. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 10 мин.
9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
10. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3–5 раз.
11. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
13. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3–5 раз.
14. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
15. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объемом не более 20–30 мкл.
16. Откройте пробирки и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
17. Добавьте к осадку по **50 мкл (ПРОБА-НК)** или по **300 мкл (ПРОБА-НК-ПЛЮС)** буфера для растворения, закройте пробирки.
18. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 с.
19. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
20. Осадите конденсат центрифугированием при RCF(g) 12000 – 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 30 с.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С не более одного месяца или при температуре от минус 72 °С до минус 68 °С не более одного года.

Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР после хранения необходимо разморозить препарат ДНК и отрицательный контрольный образец при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, затем встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Для препарата ДНК допускается только однократное размораживание!

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.