



В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов БакСкрин ОКИ 2 в фасовке S.
Перед началом работы изучите инструкцию.

**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



R1-P507-23/9 (Фасовка S, пробирки)

R1-P507-S3/9 (Фасовка S, стрипы)

Информация о наборе реагентов

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.

Выделение ДНК¹:

Рекомендуются комплекты реагентов для выделения ДНК ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛИУС, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛИУС, ПРОБА-ОПТИМА, ПРОБА-МЧ МАКС (ООО «ДНК-Технология ТС»).

Специализированное оборудование:

Детектирующие амплификаторы планшетного и роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированные в установленном порядке в РФ, например, детектирующие амплификаторы «ДТпрайм»², «ДТлайт»³ (ООО «НПО ДНК-Технология»), СFX96 (Био-Рад Лабораториз, Инк).

Количество анализируемых образцов:

96 определений (не более 24 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-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 ⁴	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ⁵	12 шт.		

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</i> spp.	<i>Shigella</i> /EIEC	ОБМ*	<i>Yersinia enterocolitica</i>

* – контрольный показатель

¹ – возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала

² – модификация 5M*

³ – модификация 5M*

⁴ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

⁵ – входят в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации, запечатанной парафином, в стрипы

Проведение анализа

1 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирку 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!

- 1.1** 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 вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 2 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 2 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 4.

- 1.2** Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.

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

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

- 1.5** Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке 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 ДНК.

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-вортке в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортке 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-вортке 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-вортке в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортке 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.

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

- 1.7** Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

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

- 1.9** Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с.

- 1.10** Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора.

- 1.11** 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. 1.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

- 1.12** Для детектирующих амплификаторов CFX96:

Проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 3.

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

Т а б л и ц а 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	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						

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °C	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 °C			

- 2 Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводятся автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.
- При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction Curve Fit».
- Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицами 4,5. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Т а б л и ц а 4 – 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	Недоверенный результат ²
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 – допускается хранение при температуре 10 °C

² – 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)

Т а б л и ц а 5 – 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 ...»					

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».

При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации. При получении для положительного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

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.

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.

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 защищенном от света месте.

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

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

Символы, используемые при маркировке набора реагентов

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