



## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления ДНК  
бактерий *Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp.  
методом ПЦР в режиме реального времени

***Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp.**

Регистрационное удостоверение  
№ РЗН 2025/25518 от 30 мая 2025 года

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 .....	9
3.4	Диагностические характеристики .....	10
3.5	Воспроизводимость и повторяемость .....	10
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	11
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ .....	13
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ .....	15
6.1	Материал для исследования .....	15
6.2	Общие требования .....	15
6.3	Взятие материала на исследование .....	15
6.4	Транспортирование и хранение образцов биологического материала .....	16
6.5	Подготовка биологического материала для выделения ДНК .....	17
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА .....	18
7.1	Выделение ДНК .....	18
7.2	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S .....	18
7.3	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование .....	21
7.4	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим .....	25
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ .....	26
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	27
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ .....	29
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ .....	30
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	30
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ .....	30
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ .....	31
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ .....	32
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ .....	33
	Приложение А .....	34
	Приложение Б .....	35
	Приложение В .....	36

## 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
РНКазы	- рибонуклеазы

## 1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

**1.1** Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp. методом ПЦР в режиме реального времени (*Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp.), далее по тексту – набор реагентов.

**1.2** Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК бактерий патоваров *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli* (EIEC) (без дифференциации) и рода *Salmonella* 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*.

**1.4** Показания к проведению исследования: симптомы инфекционных заболеваний, вызванных возбудителями острых кишечных инфекций, и эпидемиологически связанные случаи; скрининг бессимптомного носительства *Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp.

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 клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

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

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

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp. методом ПЦР в режиме реального времени (*Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp.) выпускается в стандартной фасовке (маркируется – фасовка S, стрипы; фасовка S, пробирки) и в универсальной фасовке для ручного и автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка U).

### 2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P503-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	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 <sup>1</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-P503-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонента	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 <sup>1</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-P503-UA/9, фасовка U			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец <sup>1</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

<sup>1</sup> – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+»

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 (рекомендуется постановка 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 Таq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для стандартной фасовки набора реагентов 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°C. 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, использующихся для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов определяемых бактерий, включены флуоресцентные метки Hex, Rox и Cy5. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации общей бактериальной массы (ОБМ), входит флуоресцентный краситель Fam. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

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

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ОБМ*	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella/EIEC(ipaH)</i>	<i>Shigella/EIEC(invE)</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 *Shigella/EIEC* и *Salmonella* spp.

### 3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих ДНК выявляемых анализаторов, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемых анализаторов, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке по заявленным каналам детекции отсутствует, но присутствует для общей бактериальной массы (ОБМ) по каналу детекции Fam.

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 ГКБ № 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 клиническом 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*, *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*, *Methanospaera 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*, энтероинвазивные *Escherichia coli* (EIEC) и/или ДНК человека в концентрации до  $1,0 \times 10^8$  копий/мл образца.

Наблюдалось отсутствие перекрестных неспецифических реакций каждого компонента, входящего в состав набора реагентов, 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/недостоверных) результатов. Признаком полного ингибиования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации ОБМ и специфического продукта.

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 ингибиование ПЦР, представлены в таблице ниже.

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Концентрация интерферирующих веществ
<i>Эндогенные вещества</i>		
Кал (фекалии)	Билирубин	684 мкмоль/л
	Холестерин	13 ммоль/л
	Гемоглобин	0,35 мг/мл
	Триглицериды	37 ммоль/л
	Муцин	20%
<i>Экзогенные вещества</i>		
Кал (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 пробоподготовки. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала.

### 3.3 Предел обнаружения

Пределы обнаружения микроорганизмов, выявляемых с помощью набора реагентов Shigella/EIEC и Salmonella spp., 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 на амплификационную пробирку	Копий/мл препарата ДНК	Копий/мл биологического материала (фекальной супензии)					
			ПРОБА НК	ПРОБА-ГС	ПРОБА-ГС-ПЛЮС	ПРОБА-ОПТИМА	ПРОБА-МЧ МАКС, ПРОБА-НК-ПЛЮС	
Salmonella spp.	15	3,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>
Shigella/EIEC ( <i>ipaH</i> )	15	3,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>
Shigella/EIEC ( <i>invE</i> )	15	3,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>

### 3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Аналит	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Фекалии	<i>Salmonella</i> spp.	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	<i>Shigella/EIEC</i>	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)
Бактериальные культуры	<i>Salmonella</i> spp.	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	<i>Shigella/EIEC</i>	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)	100% (95% ДИ: 92,89% – 100%)
<b>Итого</b>		100% (95% ДИ: 97,57% – 100%)	100% (95% ДИ: 97,57% – 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 клинико-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 промаркованы.

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 клинико-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 MAX	–	Нет опасных веществ	–
ПЦР-буфер	–	Нет опасных веществ	–
Положительный контрольный образец	<b>Азид натрия менее 0,1%</b>	<b>Азид натрия менее 0,1%</b>	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 слизистой оболочкой.

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 Shigella/EIEC и Salmonella spp. требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипсы	пробирки	ручное	автоматизированное
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени <sup>1</sup>	да	да	да	да <sup>2</sup>
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 <sup>3</sup>	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	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 ДТстрип по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12М1 или 15М1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту - ДТстрип	нет	нет	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрип 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 <sup>4</sup>	да
центрифуга с RCF(g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	нет	да <sup>4</sup>	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов	нет	нет	да <sup>4</sup>	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да

<b>Оборудование, реагенты и расходные материалы</b>	<b>Фасовка S</b>		<b>Фасовка U, дозирование</b>	
	стрипсы	пробирки	ручное	автомати- зированное
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный				
Набор/комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала <sup>5</sup> , рекомендуются:				
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14391;</li> <li>– 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</li> <li>– 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;</li> <li>– Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496</li> </ul>				
Дополнительно для предобработки фекалий:				
глицерин				
<b>Примечания к таблице:</b>				
<sup>1</sup> – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже				
<sup>2</sup> – валидирован детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм *Х*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229				
<sup>3</sup> – только при использовании пробирок				
<sup>4</sup> – только при использовании микропланшетов				
<sup>5</sup> – возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала				

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

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

Набор реагентов на клинических испытаниях валидирован со следующими детектирующими амплификаторами:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм \*М\*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм \*Х\*») 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 \*Х\*»;

- Амплификатор детектирующий «ДТлайт» (модификация «ДТлайт \*S\*»), 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 Лабораториез, 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

- 6.2.1 Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.
- 6.2.2 Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.
- 6.2.3 На этапе подготовки биоматериала используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
- 6.2.4 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 метода<sup>1</sup>:** исследование рекомендовано проводить не ранее, чем через два дня после окончания приёма энтеросорбентов.

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

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 и ПРОБА-ГС-ПЛЮС:

Для анализа используют образцы фекалий массой (объёмом) 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.

#### 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 и ПРОБА-ГС-ПЛЮС:

Взятие материала с жидких и плотных сред проводится в одноразовые пластиковые пробирки объёмом 1,5–2,0 мл, в которые предварительно внесено 500 мкл стерильного физиологического раствора. При помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя в каждую пробирку помещают одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды.

После взятия материала пробирки плотно закрывают и маркируют.

### 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 хранить<sup>1</sup>:

Образцы фекалий:

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

Фекальную суспензию с глицерином:

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

Бактериальные культуры:

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

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

## 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 и 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.
- 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 промаркованные 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 или 50 мкл отрицательного контрольного образца, согласно инструкции по применению используемого набора 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

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-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, 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 Shigella/EIEC и Salmonella spp.

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-ПЛЮС, 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-ПЛЮС, 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	50

**ВНИМАНИЕ!** Независимо от используемого набора/комплекта для выделения ДНК из исследуемого материала, одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший 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 к набору/комплекту реагентов для выделения ДНК.

### 7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

#### **ВНИМАНИЕ!**

- При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
- 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 вариабельного 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/стрипсы 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 и 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 «К-» 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 промаркованные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркованные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

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

7.2.8 Внесите в пробирку, промаркованную «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 тест<sup>1</sup>. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой 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.

<sup>1</sup> – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляемся 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 <sup>1</sup>	...	...	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) при 64 °С

### 7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

#### ВНИМАНИЕ!

- Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объёмом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок<sup>2</sup>, герметизируемые термоплёнкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постамплификационной контаминации.
- При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

<sup>1</sup> – допускается хранение при температуре 10 °С

<sup>2</sup> – для детектирующих амплификаторов «ДТлайт» микропланшеты 96 лунок не используются

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

П р и м е р : Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

П р и м е р : 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 MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

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

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

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

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

П р и м е р :

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

7.3.6 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ MAX 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 MAX необходимо готовить непосредственно перед использованием.

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

**ВНИМАНИЕ!** После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ MAX 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 и 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 «К-» 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 промаркованные пробирки/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркованные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

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

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

7.3.12 В случае использования микропланшетов ПЦР 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 тест<sup>1</sup>. 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 на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 5.

7.3.16 Для детектирующих амплификаторов CFX96:

Проведите ПЦР с учетом объема 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, °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 <sup>2</sup>	...	...	Хранение		Хранение

✓ – режим оптических измерений

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

<sup>2</sup> – допускается хранение при температуре 10 °С

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

**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!

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 ТехноТац MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

**ВНИМАНИЕ!** Полимеразу ТехноТац MAX 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 ТехноТац MAX.

7.4.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТац MAX 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 и 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 «К-» 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 MAX, с препаратами ДНК, отрицательными контрольными образцами и положительными контрольными образцами, а также микропланшет 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 тест<sup>1</sup>. 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 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.

<sup>1</sup> – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляемся 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 Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction 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, Cy5, Cp/Cq	
<b>Неизвестные образцы</b>			
Не учитывается	<b>&lt; 37</b>	Не указан (по двум каналам детекции)	<b>Обнаружена ДНК <i>Salmonella</i> spp.,</b> не обнаружена ДНК <i>Shigella/EIEC</i>
Не учитывается	<b>&gt; 39</b> или не указан	<b>&lt; 37</b> (по одному или двум каналам детекции)	<b>Обнаружена ДНК <i>Shigella/EIEC</i>,</b> не обнаружена ДНК <i>Salmonella</i> spp.
Не учитывается	<b>&lt; 37</b>	<b>&lt; 37</b> (по одному или двум каналам детекции)	<b>Обнаружена ДНК <i>Salmonella</i> spp. и <i>Shigella/EIEC</i></b>
≤ 35	<b>&gt; 39</b> или не указан	Не указан (по двум каналам детекции)	Не обнаружена ДНК <i>Salmonella</i> spp. и <i>Shigella/EIEC</i>
> 35 или не указан	<b>&gt; 39</b> или не указан	Не указан (по двум каналам детекции)	Недостоверный результат <sup>1</sup>
<b>Отрицательный контрольный образец</b>			
> 35 или не указан	<b>&gt; 39</b> или не указан	Не указан (по двум каналам детекции)	<b>Отрицательный результат</b> Результаты постановки валидны
<b>Положительный контрольный образец</b>			
<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	<b>Указан</b> (по двум каналам детекции)	<b>Положительный результат</b> Результаты постановки валидны

<sup>1</sup> – требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, 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, Cy5, Cp/Cq	
$\leq 35$	$\geq 37$ , но $\leq 39$	Не указан (по двум каналам детекции)	<b>Низкое содержание ДНК <i>Salmonella</i> spp., не обнаружена ДНК <i>Shigella/EIEC</i></b>
$\leq 35$	> 39 или не указан	$\geq 37$ (по одному или двум каналам детекции)	<b>Низкое содержание ДНК <i>Shigella/EIEC</i>, не обнаружена ДНК <i>Salmonella</i> spp.</b>
$\leq 35$	$\geq 37$ , но $\leq 39$	$\geq 37$ (по одному или двум каналам детекции)	<b>Низкое содержание ДНК <i>Salmonella</i> spp. и <i>Shigella/EIEC</i></b>

\* – если при значении Cp/Cq по каналу детекции Fam  $\leq 35$ , по каналу детекции Hex значение Cp/Cq  $\geq 37$ , но  $\leq 39$  и/или по каналам детекции Rox и/или Cy5 значение Cp/Cq  $\geq 37$ , 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 ингибиованием 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 Fam):

– Значение Cp/Cq ОБМ  $> 35$  при отсутствии специфических положительных результатов в пробирке следует интерпретировать как недостаточное количество материала или возможное ингибиование 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 (Hex, Rox или Cy5). Интерпретация результата – «обнаружено» («+»).

Положительный результат амплификации для двух или одного любого маркеров *Shigella/EIEC* (*ipaH*, *invE*) свидетельствует о присутствии в образце ДНК *Shigella/EIEC*.

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

**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 °C до 25 °C не более 5 суток.

#### **10.1.3 Фасовка U**

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

10.1.3.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТаq MAX в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °C 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 °C до 8 °C 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 ТехноТаq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2.2 Полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °C до минус 18 °C 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 ТехноТаq MAX (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности;
  - полимеразу ТехноТаq MAX (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности;
  - 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.
- 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**

<b>IVD</b>	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Использовать до
<b>LOT</b>	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
<b>REF</b>	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 *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. 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 использовании 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](mailto:hotline@dna-technology.ru),

[www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение  
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»  
при использовании набора реагентов Shigella/EIEC и Salmonella spp.  
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, °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 <sup>1</sup>	...	...	Хранение		Хранение

✓ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ОБМ	Salmonella spp.	Shigella/EIEC(ipaH)	Shigella/EIEC(invE)	-

<sup>1</sup> – допускается хранение при температуре 10 °C

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение  
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»  
при использовании набора реагентов Shigella/EIEC и Salmonella spp.  
в фасовке U**

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

№ 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 <sup>1</sup>	...	...	Хранение		Хранение

✓ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ОБМ	Salmonella spp.	Shigella/EIEC(ipaH)	Shigella/EIEC(invE)	-

<sup>1</sup> – допускается хранение при температуре 10 °C

**Сокращённая методика выделения ДНК из исследуемого материала  
(фекалии, бактериальные культуры) с использованием комплекта реагентов  
ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС**

**ВНИМАНИЕ!**

1. Перед началом работы необходимо:
  - включить термостат для прогревания до 65 °C;
  - 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 прогретом до 65 °C, 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 °C до 25 °C). Осадок также можно растворить при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) 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.», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).
3. Промаркируйте по одной одноразовой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого неизвестного образца и для отрицательного контрольного образца (К–).
4. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
5. Центрифугируйте пробирки с образцами суспензий фекалий при RCF(g) 13000 при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) в течение 30 с для осаждения дебриса на дно пробирки.
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. 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.
7. Внесите в пробирку, промаркированную «К–», 100 мкл отрицательного контрольного образца. Плотно закройте пробирки, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
8. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °C в течение 5 мин.

7. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
8. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
9. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
10. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
11. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3–5 раз.
12. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 1 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
13. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
14. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3–5 раз.
15. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 1 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
16. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объемом не более 20–30 мкл.
17. Откройте пробирки и высушите осадок при температуре 65 °C в течение 5 мин.
18. Добавьте к осадку по **50 мкл (ПРОБА-НК) или по 300 мкл (ПРОБА-НК-ПЛЮС)** буфера для растворения, закройте пробирки.
19. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 с.
20. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °C в течение 5 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
21. Осадите конденсат центрифугированием при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 30 с при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 22 °C до минус 18 °C не более одного месяца или при температуре от минус 72 °C до минус 68 °C 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 °C до 25 °C) или при температуре от 2 °C до 8 °C, 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.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.