

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2025/25518 от 30 мая 2025 года**В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов *Shigella*/EIEC и *Salmonella* spp. в фасовке S. Перед началом работы изучите инструкцию.**

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

REF**R1-P503-23/9 (Фасовка S, пробирки)****R1-P503-S3/9 (Фасовка S, стрипы)**

Информация о наборе реагентов

Назначение:

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК бактерий патогенов *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.

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»), CFX96 (Био-Рад Лабораториес, 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 объём 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.		

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

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

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

² – модификация *М*

³ – модификация *S*

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 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!

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 Taq-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 Taq-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 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-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 «К-» 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 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 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

Таблица 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						

Таблица 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	0:15	50
4	64 ✓	0:20	
✓ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex, Rox, Cy5) 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.

Таблица 4 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции			Интерпретация результата
Fam, Cp/Cq	Hex, Cp/Cq	Rox, Cy5, Cp/Cq	
Неизвестные образцы			
Не учитывается	< 37	Не указан (по двум каналам детекции)	Обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i> , не обнаружена ДНК <i>Shigella</i> /EIEC
Не учитывается	> 39 или не указан	< 37 (по одному или двум каналам детекции)	Обнаружена ДНК <i>Shigella</i> /EIEC, не обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i>
Не учитывается	< 37	< 37 (по одному или двум каналам детекции)	Обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i> и <i>Shigella</i> /EIEC
≤ 35	> 39 или не указан	Не указан (по двум каналам детекции)	Не обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i> и <i>Shigella</i> /EIEC
> 35 или не указан	> 39 или не указан	Не указан (по двум каналам детекции)	Недостоверный результат ²
Отрицательный контрольный образец			
> 35 или не указан	> 39 или не указан	Не указан (по двум каналам детекции)	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец			
Указан	Указан	Указан (по двум каналам детекции)	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, 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, Cy5, Cp/Cq	
≤ 35	≥ 37, но ≤ 39	Не указан (по двум каналам детекции)	Низкое содержание ДНК Salmonella spp. , не обнаружена ДНК <i>Shigella</i> /EIEC
≤ 35	> 39 или не указан	≥ 37 (по одному или двум каналам детекции)	Низкое содержание ДНК Shigella /EIEC, не обнаружена ДНК <i>Salmonella</i> spp.
≤ 35	≥ 37, но ≤ 39	≥ 37 (по одному или двум каналам детекции)	Низкое содержание ДНК Salmonella spp. и Shigella /EIEC
* – если при значении Cp/Cq по каналу детекции Fam ≤ 35, по каналу детекции Hex значение Cp/Cq ≥ 37, но ≤ 39 и/или по каналам детекции Rox и/или Cy5 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 Fam): 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 холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом 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.