




Набор реагентов для выявления ДНК микроорганизмов рода *Salmonella* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени»

«АмплиПрайм® Сальмонеллез»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2117-1Z  96

Только для ветеринарных и других
немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	5
4. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ.....	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6.1. Взятие исследуемого материала.....	8
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала.....	8
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	8
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	9
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	10
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала	10
7.2. Подготовка материала к исследованию.....	11
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	11
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала.....	11
8.2. Подготовка реагентов для амплификации.....	12
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	13
8.4. Анализ и обработка результатов	14
8.5. Используемые настройки амплификаторов	14
8.6. Интерпретация результатов	15
8.7. Возможные ошибки	16
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	17
9.1. Предел обнаружения	17
9.2. Аналитическая специфичность.....	17
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	18
10.1. Срок годности	18
10.2. Транспортирование.....	18
10.3. Хранение	18
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	19

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Сt	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
ОК	отрицательный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
К-	отрицательный контроль ПЦР
ПК	положительный контроль
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
МРС	мелкий рогатый скот
КРС	крупный рогатый скот
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК микроорганизмов рода *Salmonella* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Сальмонеллез».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Сальмонеллез», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Сальмонеллез» предназначен для выявления ДНК микроорганизмов рода *Salmonella* в биологическом материале от животных (кровь, фекалии, молоко, тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, лимфатические узлы, абортированные плоды), околоплодная жидкость) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор выпускается в единой форме. Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор используется для ручной методики выделения НК или совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь Сальмонелла	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Сальмонелла	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	–	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Вкладыш к набору для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В) и одновременной амплификации специфических участков ДНК микроорганизмов рода *Salmonella* и ДНК внутреннего контрольного образца ВКО В (искусственно-синтезированная последовательность) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. ВКО В позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проходит амплификация специфического участка ДНК микроорганизмов рода *Salmonella* и ДНК внутреннего контрольного образца ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по 2-м различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ¹
НК-мишень	ВКО В	ДНК микроорганизмов рода <i>Salmonella</i>
Область ампликации	Искусственно-синтезированная последовательность	invA ген

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® Сальмонеллез» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

¹ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

4. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для ветеринарных целей и других немедицинских целей.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® Сальмонеллез» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом экстракции – «ВКО В», входящим в состав набора для проведения экстракции НК. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Непригодными для исследования являются образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта и образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

4.6. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований 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» и правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения при проведении ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

- 6.1.1. Вакуумные пробирки для забора крови с антикоагулянтом (ЭДТА или цитратом натрия).
- 6.1.2. Двухсторонние иглы для забора крови в вакуумные пробирки.
- 6.1.3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный.
- 6.1.4. Пластиковый пакет с застежкой Zip-lock.
- 6.1.5. Стерильная посуда для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов.
- 6.1.6. Шпатель одноразовый или лопатка для взятия биологического материала;
- 6.1.7. Ножницы, скальпели, пинцеты.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

- 6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2,0 мл.
- 6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5, 15 или 50 мл.
- 6.2.3. Стерильные фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.
- 6.2.4. Вортекс.
- 6.2.5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2,0 мл с ускорением не менее 10000g.
- 6.2.6. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» с ускорением не менее 2000g.
- 6.2.7. Ножницы, скальпели, пинцеты, лопатка.
- 6.2.8. Фосфатно-солевой буфер или стерильный физиологический раствор.
- 6.2.9. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.
- 6.2.10. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК «МагноПрайм ВЕТ» («Формат 96») производства ООО «НекстБио», Россия, или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой набор, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять НК из биологического материала от животных (кровь, фекалии, молоко, тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, лимфатические узлы, абортинированные плоды), околоплодная жидкость) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
- состав набора включает реагент ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В (внутренний контрольный образец);
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции ДНК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм ВЕТ» формы выпуска «Формат Контроли». Реагент ВКО В следует добавлять во все исследуемые образцы, а также в отрицательный контрольный образец (ОКО).

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции - в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие двух и более независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM и R6G с характеристиками, указанными в таблице 4:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4$ °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

6.4.9. Холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температурный режим от минус 24 °С до минус 16 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит биологический материал от животных:

- Кровь, фекалии, молоко, околоплодная жидкость;
- Тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, лимфатические узлы, абортированные плоды).

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Взятие венозной **крови** проводится после длительного голодания (не менее 6 часов) в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия).

Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 2 суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Молоко, околоплодную жидкость отбирают в объеме 30 – 50 мл в стерильную посуду или стерильные пластиковые контейнеры для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Фекалии (1 – 5 г) отбирают отдельным шпателем в стерильный пластиковый контейнер для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл.

Тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, лимфатические узлы, абортированные плоды) размером 1×1×1 см отбирают в стерильные пластиковые контейнеры или пакеты с застежкой Zip-lock.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение требований может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Кровь используется без предварительной подготовки.

Тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, лимфатические узлы, абортированные плоды) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10% суспензию, используя стерильный физиологический раствор или фосфатный буфер. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК.

Пробы исследуемых жидкостей (молоко, околоплодная жидкость), кроме крови, в объеме 10 мл центрифугируют при 3 тыс. об./мин. в течение 10-15 мин. При необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора. Супернатант осторожно сливают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Осадок суспендируют в оставшейся надосадочной жидкости, переносят в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и 100 мкл суспензии используют для экстракции ДНК.

Фекалии тщательно ресуспендируют в 5 мл физиологического раствора (готовят 5 – 10 % суспензию). Суспензию центрифугируют на низкооборотной центрифуге при 1,5 тыс. об./мин. в течение 5 минут и 100 мкл супернатанта используют для экстракции ДНК.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории²:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75%.

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)³ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В).

² Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

³ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца⁴ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента **ВКО В** - **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем реагента **ОКО** - **100 мкл** в пробирку для **ОКО**;

– объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции НК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ») или **100 мкл** (при использовании набора «МагноПрайм ВЕТ» или **50 – 100 мкл** (при использовании другого набора для экстракции согласно инструкции к нему).

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Сальмонелла** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Сальмонелла	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли.
Буфер В	$5,0 \cdot (N+1)$	

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Сальмонелла** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученных на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

⁴ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПК)** – в одну пробирку для образца **ПК** внести **10 мкл ПКО Сальмонелла**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в одну пробирку для образца **ОК** внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

в) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл** реагента **К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G ⁵	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание: необходимо перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

⁵ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

– в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых (см. п. 8.5.) зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G
Продукт амплификации	ДНК ВКО	invA ген

8.5. Используемые настройки амплификаторов

Рекомендуемые настройки для приборов указаны в таблицах 8 – 10.

Таблица 8

Рекомендуемые настройки для приборов роторного типа

Канал	Опт.уровня сигнала	Порог	Устранение выбросов	Коррект. уклона	Динамический фон	Исключить циклы
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	0,03	≤ 15 %	включена	включен	от 1 до 5
R6G/Yellow	от 5 FI до 10 FI	0,03	≤ 15 %	включена	включен	от 1 до 5

При запуске прибора роторного типа в окне «Автооптимизация уровня сигнала» активировать функцию «Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции».

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки согласно таблице 9.

Таблица 9

Настройки для прибора «CFX96»

Параметр	Шаг этапа циклирования	Ramp Rate
Step Options	95 °C	2,5 °C/sec
	60 °C	2,5 °C/sec

Анализ результатов для прибора «CFX96».

Провести анализ результатов по каналам **FAM** и **R6G** (для каждого канала по отдельности), активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.

Для настройки базовой линии выберите меню **Settings** (Настройки), затем последовательно нажмите кнопки **Base Line Subtracted Curve Fit** (Подбор кривой по точкам с вычетом базовой линии) и **Apply Fluorescence Drift Correction** (Применить коррекцию смещения флуоресценции). В меню **Threshold Cycle Calculation** (Пороговый уровень базовой линии) выбрать режим ручной установки пороговой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** (Циклы базовой линии) выбрать **Auto Calculated** (Рассчитан автоматически), а в подменю **Single Threshold** (Единый пороговый уровень) выбрать **User Defined** (Определен пользователем) и применить настройки, указанные в таблице 10.

Таблица 10

Рекомендуемые настройки для приборов планшетного типа

Канал	Threshold / Порог	Исключить циклы
FAM	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ОК в последнем цикле амплификации.	от 1 до 5
R6G	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ПКО Сальмонелла в последнем цикле амплификации.	от 1 до 5

8.6. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицей 12. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 11 и 12 соответственно.

Таблица 11

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ПКО Сальмонелла (положительный контроль)	Отсутствует	Определено Ct ≤ 26,5 / ≤ 32,5
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено Ct ≤ 29,5 / ≤ 34,0	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено $\leq 40,0 / \leq 40,0$.	ДНК микроорганизмов рода <i>Salmonella</i> не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено $\leq 42,0 / \leq 42,0$. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	ДНК микроорганизмов рода <i>Salmonella</i> обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено $> 42,0 / > 42,0$, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено $\leq 40,0 / \leq 40,0$.	Результат недостоверный / сомнительный Рекомендуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует или определено $> 42,0 / > 42,0$, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено $> 40,0 / > 40,0$.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

ВНИМАНИЕ! В случае получения сомнительного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения сомнительного или получения отрицательного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа отбора материала.

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналу для флуорофора R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.7.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G определены значения пороговых циклов (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

8.7.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию/ПЦР и детекцию для этого образца.

8.7.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM и R6G, что свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения⁶

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Сальмонеллез» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $5,0 \times 10^2$ копий/мл для ДНК микроорганизмов рода *Salmonella* (см. таблицу 13). Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 13

Предел обнаружения набора

Микроорганизм	Предел обнаружения, копий/мл
ДНК микроорганизмов рода <i>Salmonella</i>	$5,0 \times 10^2$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК микроорганизмов рода *Salmonella*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов (см. таблицу 14). НК микроорганизмов в концентрации не менее $1,0 \times 10^6$ копий/мл, вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемую с помощью набора ДНК микроорганизмов рода *Salmonella*.

Таблица 14

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae gravis</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Shigella spp.</i>
<i>Yersinia spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК свиньи, МРС, КРС, собаки, кошки.

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

⁶ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемых возбудителей, при которой 95% тестов дают положительный результат).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Допускается транспортирование не более 3 суток при температуре от 8 до 25 °С.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Сальмонелла и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® Сальмонеллез» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Код партии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению