

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
набора реагентов
«АмплиСенс[®] *Salmonella* spp.-FL»

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	11
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F)	13
СОСТАВ	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ».....	14
А. Подготовка проб для амплификации	14
Б. Проведение амплификации.....	16
В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке» ...	16
Г. Интерпретация результатов	17
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50F)	19
СОСТАВ	19
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	19
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	20
А. Подготовка проб для амплификации	20
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	21
В. Анализ и интерпретация результатов	22
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	25
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	26
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	27
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	28

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Salmonella* spp.-FL» не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для качественного определения ДНК *Salmonella* spp. в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из среды для первичного обогащения исследуемого продукта питания (селенитовый бульон), проведенного в соответствии с действующей нормативно-методической документацией.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые 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. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется либо непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», либо после окончания ПЦР (детекция по «конечной точке») – с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. 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 дезоксиуридинтрифосфат 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 проводятся 2 реакции – амплификация ДНК *Salmonella* spp., а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *Salmonella* spp., а так же ДНК ВКО-FL регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Salmonella</i> spp.
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	Ttr (ген тиоционат редуктазы)

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

Форма 2: наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой

фасовке.

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке», либо в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли и фоновые образцы.

ВНИМАНИЕ! Форма 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Селенитовый бульон	«ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1×10^3
Селенитовый бульон	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1×10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов/штаммов:

- *Salmomella* spp. – 18 штаммов различных серогрупп; *Cronobacter sakazakii* – 3 штамма; *Enterobacter cloacae* – 4 штамма; *Enterobacter aerogenes* – 2 штамма; *Pantoea agglomerans* – 2 штамма; *Campylobacter* spp. (*C.jejuni*, *C.coli*, *C.fetus fetus*) – 8 штаммов; *Esherichia coli* – 31 штамм различных серогрупп (включая *EHEC*, *EPEC*, *ETEC*, *EAggEC*, *EIEC*); *Shigella* spp. – 12 штаммов различных видов и серогрупп; *Yersinia* spp. – 22 штамма различных видов и серогрупп; *Citrobacter freundii*; *Clostridium perfringens*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Protrus mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Serratia marcessens*.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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 фильтром². Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- 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 для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

² Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- 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.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В» (РУ № ФСР 2009/05220) «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл, 0,2 мл или 0,1 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
7. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

При проведении детекции «по конечной точке»:

11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого амплификатора, например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cycler

(Corbett Research, Австралия Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США), MaxyGene (Axygen, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) и другие, рекомендованные Изготовителем).

14. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия), «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и другие, рекомендованные Изготовителем).

При проведении детекции в режиме «реального времени»:

15. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

16. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000 Q (Corbett Research, Австралия QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).

17. ПО для автоматической обработки результатов.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из среды для первичного обогащения исследуемого продукта питания (селенитовый бульон), проведенного в соответствии с действующей нормативно-методической документацией.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы селенитового бульона не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава набора реагентов и конфигурации анализа, которые позволяют контролировать влияние всего спектра потенциально интерферирующих веществ на метод полимеразной цепной реакции:

- использование специфичных праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, комплементарных участкам выявляемых ДНК-мишеней;
- соблюдение правил взятия и предварительной подготовки исследуемого материала;
- экстракция ДНК из образцов исследуемого материала с использованием экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

Критерием отсутствия влияния потенциально интерферирующих веществ является наличие сигнала ДНК ВКО-FL по окончании реакции амплификации. В случае отсутствия сигнала ДНК ВКО-FL и ДНК исследуемых патогенов, результат анализа является невалидным.

В виду указанных особенностей состава набора реагентов и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов;
- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации по «конечной точке»;
- анализ и интерпретация результатов.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Salmonella* spp. с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Salmonella</i> spp.	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
K+ <i>Salmonella</i> spp.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли и фоновые образцы.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» и другие, рекомендованные Изготовителем. Порядок работы с комплектами реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют образец стерильной среды для первичного обогащения. Перед применением среды для первичного

обогащения рекомендуется тестирование ее стерильного образца на возможное содержание ДНК искомого микроорганизма.

ВНИМАНИЕ! При экстракции ДНК из исследуемых образцов используется только Буфер для элюции В, входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс[®] *Salmonella* spp.-FL».

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Таq-полимеразы (ТаqF-ДНК-полимераза), которая активируется при прогреве реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 15 мин.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас на несколько реакций.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении 1**.

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

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Salmonella* spp. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL *Salmonella* spp., ПЦР-буфером-В, осадить капли на вортексе.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб с учетом пробирок «Фон».

4. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *Salmonella* spp.** и **ПЦР-буфера-В**, осадить капли на вортексе.

5. Приготовить 2 пробирки «Фон». Для этого внести по **15 мкл** приготовленной смеси (без полимеразы (TaqF)) в две пробирки «Фон», добавить по **10 мкл K-**, перемешать пипетированием. Сверху раскатать по 1 капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С в защищенном от света месте и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии и того же типа ПЦР-пробирок.

6. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить **полимеразу (TaqF)**. Перемешать и осадить капли на вортексе.
7. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленных реакционных смесей. Сверху раскатать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл). Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
8. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

9. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из стерильного образца среды для первичного обогащения;
 - б) **положительный контроль ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ *Salmonella* spp.**;
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (K-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K-**;

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 3).
2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание – Рекомендуются перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

Таблица 3

Программа амплификации ДНК

Цикл	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке) ³			Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке) ⁴			Амплификаторы с матричным регулированием температуры ⁵		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	1 мин	42
	60 °С	10 с		60 °С	25 с		60 °С	1 мин	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	1 мин	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Таблица 4

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Salmonella</i> spp.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору

³ GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»).

⁴ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research).

⁵ Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research).

реагентов).

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам детекции. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Таблица 5

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	ДНК <i>Salmonella</i> spp. обнаружена
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	ДНК <i>Salmonella</i> spp. не обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Невалидный*
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения отрицательного результата и <u>ниже</u> порогового значения положительного результата	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения флуоресцентных сигналов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с

табл. 6 и пороговыми значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 6

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
K+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата
K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения положительного результата. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Salmonella* spp.
2. Для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу для флуорофора JOE выше порогового значения положительного результата. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Salmonella* spp., начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (OK – образец стерильной культуральной среды) могут быть связаны с загрязнением среды для первичного обогащения генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить исследование с этапа первичного обогащения с применением сред, не содержащих ДНК искомого микроорганизма, с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля экстракции реагента OKO.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50F)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50F – комплект реагентов для амплификации ДНК *Salmonella* spp. с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Salmonella</i> spp.	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
К+ <i>Salmonella</i> spp.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Для оценки жизнеспособности микроорганизма рекомендуется проводить одновременное исследование с детекцией в режиме «реального времени» двух образцов среды: образца, взятого после предписанной инкубации микроорганизма при оптимальной для его роста температуре и аналогичного образца, взятого непосредственно после посева материала и сохранявшегося до момента исследования при температуре минус 20 °С. Отставание сигнала по каналу для флуорофора JOE на 3 и более пороговых цикла (Ct) для образца, сохранявшегося при температуре минус 20 °С,

свидетельствует о наличии в продукте жизнеспособного микроорганизма.

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» и другие, рекомендованные Изготовителем. Порядок работы с комплектами реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют образец стерильной среды для первичного обогащения. Перед применением среды для первичного обогащения рекомендуется тестирование ее стерильного образца на возможное содержание ДНК искомого микроорганизма.

ВНИМАНИЕ! При экстракции ДНК из исследуемых образцов используется только Буфер для элюции В, входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс® *Salmonella* spp.-FL».

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас на несколько реакций.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении 2**.

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

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Salmonella* spp. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL *Salmonella* spp., ПЦР-буфером-В, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
4. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL *Salmonella* spp., ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF), осадить капли на вортексе.
5. Внести в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из стерильного образца среды для первичного обогащения;
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К+ *Salmonella* spp.;
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К–.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью соответствующего ПО.

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7).

Таблица 7

**Программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁶ и
планшетного⁷ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	10 с	-	45
	60	25 с	FAM, JOE	
	72	10 с	-	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием ПО.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО	ДНК <i>Salmonella</i> spp.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем

⁶ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁷ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u>	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>Salmonella</i> spp. обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	ДНК <i>Salmonella</i> spp. не обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного
К-	ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналу для флуорофора JOE больше граничного значения. Необходимо

- повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Salmonella* spp.
2. Для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу для флуорофора JOE меньше граничного значения. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Salmonella* spp., начиная с этапа экстракции ДНК.
 3. Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК – образец стерильной культуральной среды) могут быть связаны с загрязнением среды для первичного обогащения генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить исследование с этапа первичного обогащения с применением сред, не содержащих ДНК искомого микроорганизма, с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля экстракции реагента ОКО.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50F хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL *Salmonella* spp., ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL *Salmonella* spp., ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Salmonella* spp. Хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁸.

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Только для исследовательских и иных немедицинских целей		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**Схема приготовления реакционных смесей
для детекции по «конечной точке»**

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Количество реакций ⁹	ПЦР-смесь-FL <i>Salmonella</i> spp., мкл	ПЦР-буфер-В, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
8	80	40	3,0
10	100	50	4,0
12	120	60	5,0
14	140	70	6,0
16	160	80	7,0
18	180	90	8,0
20	200	100	9,0
22	220	110	10,0
24	240	120	11,0
26	260	130	12,0
28	280	140	13,0
30	300	150	14,0
32	320	160	15,0

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемой в реакционную смесь полимеразы (TaqF), приведено с учетом уже отобранных **30 мкл** реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

⁹ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроль экстракции ДНК (ОК), контроли ПЦР (К+, К-) и 2 пробирки «Фон» + запас на один образец (N+1+4+1).

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Схема приготовления реакционных смесей для детекции в режиме «реального времени»

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Количество реакций ¹⁰	ПЦР-смесь-FL <i>Salmonella</i> spp., мкл	ПЦР-буфер-В, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
6	60	30	3,0
8	80	40	4,0
10	100	50	5,0
12	120	60	6,0
14	140	70	7,0
16	160	80	8,0
18	180	90	9,0
20	200	100	10,0
22	220	110	11,0
24	240	120	12,0
26	260	130	13,0
28	280	140	14,0
30	300	150	15,0
32	320	160	16,0

¹⁰ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроль экстракции (OK), контроли этапа ПЦР (K+, K-) + запас на один образец (N+1+2+1).

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
11.05.10	-	Добавлена фраза про анкету потребителя
16.11.10	Состав	Удалена фраза «по конечной точке из варианта FRT»
16.08.11 LA	По тексту	Добавлен раздел «Символы, используемые в печатной продукции»
		Изменено название института на ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
		«Вариант FEP/FRT» исправлен на «формат FEP/FRT»
		Исправления по шаблону
	Форма комплектации	Добавлена форма 2 – комплектация наборов оптом
	Меры предосторожности	СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» исправлены на СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
		МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III–IV групп патогенности» исправлены на МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Добавлена информация о хранении вскрытых реагентов
Удалены реквизиты ФГУН ГИСК		
Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»	
Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы	
30.09.11 VV	Титульная страница	Добавлены символ, наименование и адрес производителя
		Символ «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» перемещен в правый нижний угол страницы
		Удалена информация из нижнего колонтитула
20.03.12 LA	Титульная страница	Символ [IVD], обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики» заменен на символ [RUO] «только для исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
	Дополнительные материалы и оборудование	«или аналогичные» заменено на «и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях...»
Сноски к программам амплификации		
11.10.12 IV	Назначение	Убраны ссылки на нормативные документы
	Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала	
21.10.12 IV	Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по	К каналам для флуорофоров добавлена сноска «Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
	«конечной точке»	реагентов»
	Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	
	По тексту	Название каналов были изменены с «канал FAM/Green и JOE/Yellow/HEX и «каналы FAM и HEX» на «канал для флуорофоров FAM и JOE»
28.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	Для символа RUO изменена фраза с «Только для исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских целей»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
04.02.15 BS	Назначение	Удалено: «ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания»
	Титульный лист Символы, используемые в печатной продукции	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
12.02.15 BO	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удален подраздел «Условия отпуска»
19.02.19 PM	По тексту	Изменено форматирование текста
20.03.19 EM	Состав	Уточнен цвет реагента
06.06.19 SK	По тексту	Правки в соответствии с шаблоном.
	Титульный лист	Название набора реагентов изменено на сокращенное
	ОГЛАВЛЕНИЕ	Добавлен Список сокращений
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	Добавлено уточнение про экзогенный внутренний контрольный образец
	Принцип метода	Раздел отредактирован по шаблону. Добавлена информация об УДГ. Добавлена таблица с ДНК-мишенями
	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	Раздел дополнен информацией об оценке вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека и об отсутствии специфических воздействий набора реагентов на организм человека
	ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	Добавлено ПО для автоматической обработки результатов
	ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	Раздел добавлен
	Состав	Замена реагентов:

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
		ПЦР-смеси-1-FL Salmonella spp./ STI на ПЦР-смесь-FL Salmonella spp.; ПКО ДНК Salmonella spp./ STI на K+ Salmonella spp.; ПЦР-смеси-2-FRT на ПЦР-буфер-В; ДНК-буфера на К-; РНК-элюента на Буфер для элюции В
	АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	Схема приготовления реакционных смесей для детекции по «конечной точке» перенесена в ПРИЛОЖЕНИЕ 1
	АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	Схема приготовления реакционных смесей для детекции в режиме «реального времени» перенесена в ПРИЛОЖЕНИЕ 2
	Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного и планшетного типа объединена в одну таблицу
	В. Анализ и интерпретация результатов	Добавлена информация о ПО для анализа и интерпретации результатов. Добавлена таблица о регистрации сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации
	Гарантийные обязательства изготовителя	Раздел добавлен
20.06.19 SK	АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	Удалено примечание о времени внесения проб и запуска амплификации
16.04.20 EM	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Назначение	Добавлено уточнение о том, что НР не является медицинским изделием