

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Топорков А.В.

« 27 »

2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ*
«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА (*BURKHOLDERIA MALLEI*) И МЕЛИОИДОЗА (*BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*) МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ «АМПЛИГЕН *BURK-MALLEI/PSEUDOMALLEI-PB*» ПО ТУ 21.20.23-013-01898084-2016»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «Амплиген *Burk-mallei/pseudomallei-PB*» по ТУ 21.20.23-013-01898084-2016», далее по тексту – набор реагентов «Амплиген *Burk-mallei/pseudomallei-PB*» предназначен для качественного обнаружения и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах клинического материала (кровь, моча, спинномозговая жидкость, содержимое абсцессов, мокрота, рвотные массы, отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, мазок из носоглотки, испражнения), секционного материала (биоптаты печени, селезенки, легкого, сердца, почки, головной мозг), биологического материала от животных (сердце, печень, легкое, селезенка, почки, головной мозг, костный мозг, кровь), объектов окружающей среды (вода, почва), твердых пищевых продуктов (рис), а также выделенных культур микроорганизмов методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Возбудитель сапа (*Burkholderia mallei*) и возбудитель мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) – аэробные грамотрицательные неферментирующие бактерии, принадлежащие к роду *Burkholderia*, относятся к микроорганизмам II группы патогенности (опасности). Сапная и мелиоидозная инфекции у людей имеют сходные клинические проявления.

Сап – зоонозная инфекция, протекающая у человека в острой септической и хронической формах со специфическими поражениями кожи, слизистых оболочек, мышц, суставов и внутренних органов. Источником инфекции для людей служат животные, обычно лошади. Заражение происходит через выделения больного животного: носовой секрет и отделяемое кожных язв, реже содержимое кишечника, моча, молоко. Основной механизм заражения контактный, возбудитель попадает в организм человека через кожу, значительно реже через слизистые оболочки верхних дыхательных путей и конъюнктиву глаз.

Мелиоидоз – инфекционное заболевание людей и животных, протекающее с явлениями сепсиса и образованием абсцессов в органах и тканях, эндемичен для ряда стран влажных субтропиков. Инфицированные животные, выделяя возбудителя с естественными жидкостями и экссудатом раневых поверхностей, обсеменяют объекты окружающей среды. Основной механизм заражения человека – контактный, реализуется при контакте поврежденной кожи или слизистых оболочек с инфицированными почвой и водой.

Набор реагентов «Амплиген *Burk-mallei/pseudomallei-PB*» используется в клинической лабораторной диагностике для исследования материала, полученного от лиц обоего пола, любого возраста с подозрением на сап и/или мелиоидоз вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания (в анамнезе находившихся на эндемичных территориях по сапу и

*Введена впервые

Инструкция по применению «Амплиген *Burk-mallei/pseudomallei-PB*» Страница 1 из 26

мелиоидозу), а также в ходе эпидемиологического мониторинга.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Для проведения исследований могут быть использованы амплификаторы для ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени типа Rotor-Gene.

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 8 реагентов:

Таблица 1

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-1 <i>B.mallei/pseudomallei</i>	смесь праймеров, зондов, дНТФ – прозрачная жидкость с бледно-розовым оттенком	0,3	1 пробирка
ПЦР-буфер-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
<i>Taq-F</i> -ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,03	1 пробирка
MgCl ₂	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 25 мМ водный раствор магния хлорида	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК <i>B. mallei</i>	препарат ДНК <i>B. mallei</i> – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК <i>B. pseudomallei</i>	препарат ДНК <i>B. pseudomallei</i> – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой раствор ДНК (фрагмент последовательности плазмиды pUC19) в ТЕ-буфере	0,08	1 пробирка
ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-HCl, Na ₂ -ЭДТА	1,0	1 пробирка

Набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» рассчитан на проведение 50 определений с учетом контрольных образцов.

Принцип метода – обнаружение специфических фрагментов ДНК сапного и мелиоидозного микробов основано на использовании мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) – представляет собой повторяющиеся циклы синтеза – амплификации специфической области ДНК-мишени в присутствии *Taq-F* полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень. При постановке ПЦР применяется «горячий старт», обеспечивающийся использованием химически модифицированной *Taq*-полимеразы – *TaqF*-ДНК-полимеразы, которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин, что значительно снижает количество не специфических реакций.

Детекция результатов осуществляется путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-PB). По каналу *FAM/Green* детектируется продукт амплификации ДНК *B. mallei*, соответствующий нуклеотидной последовательности гена *fliP* *B. mallei*, кодирующего белок биосинтеза флагеллина – *flagellar biosynthetic protein fliP*, имеющий вставку, фланкированную *IS407A*. По каналу *JOE/Yellow* детектируется продукт амплификации фрагмента ДНК возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei*, соответствующего нуклеотидной последовательности гена, кодирующей белок *gp68* и входящий в состав *RimL* региона (ацетилтрансферазы, включающие N-ацетилазы рибосомальных белков). По каналу *Cy5/Red*

детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца).

Проведение анализа включает два этапа: 1. выделение ДНК из проб клинического и биологического материала, объектов окружающей среды 2. амплификация на приборах типа Rotor-Gene. Тип используемых зондов – «молекулярные маяки». Область «петли» зонда комплементарна анализируемому продукту ПЦР. В ходе реакции происходит гибридизация молекулярного маяка с ампликоном и расстояние между флуорофором и гасителем увеличивается, что приводит к повышению флуоресценции, которую фиксирует амплификатор. Учет результатов флуоресценции проводят по каждому каналу отдельно.

Ограничение метода. В инфицированном материале *B. mallei* и *B. pseudomallei* может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения нуклеиновых кислот на уровне не менее 20%. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего контрольного образца (ВКО) (п. 7.4.5).

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения ДНК или на этапе проведения реакции ПЦР в режиме реального времени. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР-РВ (ОКВ и К_{ПЦР}-) (п. 7.4.5).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять и дифференцировать ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* в суспензиях с концентрацией не менее 1×10^3 м.к./мл

Аналитическая специфичность.

Набор не должен давать положительных результатов с ДНК гетерологичных видов микроорганизмов в суспензиях с концентрацией 1×10^7 м.к./мл.

Диагностические характеристики.

Диагностические характеристики набора установлены в лабораторных условиях с применением 14 штаммов *B. mallei*, 16 штаммов *B. pseudomallei* и 20 штаммов гетерологичных микроорганизмов из лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора на модельных образцах материала: 160 проб бактериальных суспензий возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) в концентрации 1×10^3 м.к./мл, 72 пробы клинического материала, искусственно контаминированных *B. mallei*, *B. pseudomallei* в концентрации 1×10^3 м.к./мл, 12 проб секционного материала, искусственно контаминированных *B. mallei*, *B. pseudomallei* в концентрации 1×10^3 м.к./мл, 44 пробы биологического материала, контаминированных *B. mallei*, *B. pseudomallei* в концентрации 1×10^3 м.к./мл, 16 проб объектов окружающей среды (почва, вода), контаминированных *B. mallei*, *B. pseudomallei* в концентрации 1×10^3 м.к./мл, 8 проб твердых пищевых продуктов (рис), контаминированных *B. mallei*, *B. pseudomallei* в концентрации 1×10^3 м.к./мл; 184 пробы, контаминированных близкородственными и гетерологичными микроорганизмами (*Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia cepacia*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) в концентрации 1×10^7 м.к./мл.

Определение возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*), близкородственных и гетерологичных микроорганизмов подтверждено с использованием референтного метода – молекулярно-генетического с использованием МИ «Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза, сапа и мелиоидоза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бру/сап/мелиоидоз-РВ) по ТУ 939816-017-46395995-2013», производства ЗАО «Синтол», Россия.

Диагностическая чувствительность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90% при анализе 312 положительных проб (160 проб суспензий микроорганизмов, 72 пробы

клинического материала, 12 проб секционного материала, 44 пробы биологического материала, 16 проб объектов окружающей среды, 8 проб твердых пищевых продуктов), содержащих возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) в концентрации 1×10^3 м.к./мл получен положительный результат в 309 случаях.

Диагностическая специфичность - не менее 99 % с доверительной вероятностью 90% при исследовании 184 отрицательных проб (108 проб суспензий микроорганизмов, 36 проб клинического материала, 6 проб секционного материала, 22 проб биологического материала, 8 проб объектов окружающей среды, 4 проб твердых пищевых продуктов), содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы (*Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia cepacia*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) в концентрации 1×10^7 м.к./мл получен отрицательный ответ в 184 случаях.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

4.1. Информация об инфекционных или микробных рисках

Набор реагентов может быть использован в учреждениях, имеющих Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, поэтому этапы подготовки образцов и проведение ПЦР-анализа проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МУ 4.2.2831-11 «Лабораторная диагностика сапа», МУ 4.2.2787-10 «Лабораторная диагностика мелиоидоза».

4.2. Необходимость обучения персонала

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности.

4.3. Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.4. Информация об экологических рисках

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или серий с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.5. Информация о физических рисках, в том числе возможность взрыва или возгорания.

Набор реагентов следует применять по назначению в комбинации с приборами, прошедшими надлежащее техническое обслуживание. Необходимо строгое соблюдение инструкций по эксплуатации электрооборудования, безопасности при работе с электроприборами.

4.6. Информация о рисках применения, приводящих к ошибочному результату исследования:

- Использование набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» с истекшим сроком годности;
- Нарушение условий транспортирования, хранения набора реагентов;
- Нарушения упаковки и внешнего вида компонентов набора реагентов;
- Нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- Нарушение условий окружающей среды при эксплуатации набора реагентов;
- Нарушение процесса проведения анализа, регистрации и учета результатов.
- Применение по назначению МИ в комбинации со средствами измерения, не прошедшими поверку и/или калибровку.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, необходимые при работе с изделием *:

Таблица 2

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа Rotor-Gene	Амплификаторы «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия), «RotorGene Q», («QIAGEN», Германия)
Ламинарный-поточный шкаф II класса биологической безопасности	Ламинарно-поточный шкаф II класса биологической безопасности Biowizard Standard GL- 130, Kojair, Финляндия
ПЦР-бокс	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» «Ламинарные системы», Россия
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-вортекс «Microspin FV-2400», НПФ ООО «BioSan», Латвия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, «ТЕРМО 48», «Биоком», Россия
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	Термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга «Mini-Spin», «Eppendorf», Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский «В-40», «Висма Планар» Беларусь
Холодильник	«MPR-214F» рабочий диапазон температур - основная камера от +2 до +14 °С, морозильная камера -20-30 °С, 220В, 155 Вт, «Sanyo», Япония
Дозатор 0,5-10 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 5-50 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 20-200 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 100-1000 мкл	ILS (CAPP), Дания
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
96-ти луночный алюминиевый штатив (для пробирок 0,2 мл)	«Corbett Research», Австралия; «QIAGEN», Германия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 5×10 мест с увеличенным расстоянием между лунками, «Интерлабсервис», Россия

Одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 20 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки для ПЦР объемом 0,6 мл.	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пестик для пробирок типа Eppendorf 1,5-2,0 мл	ФСЗ 2011/10287, «SSI», США
Ступка фарфоровая (№1)	ГОСТ 9147-80
Пестик фарфоровый (№1)	ГОСТ 9147-80
Порошок стеклянный марки ПС30	ГОСТ Р 52233-2004
Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-1897593-2008	ФСР 2008/03147, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В»	ФСР 2009/05220, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
Одежда одноразовая медицинская из нетканого и полимерного материалов	РЗН 2013/668
Перчатки медицинские диагностические одноразовые. Часть 1. Спецификация на перчатки из каучукового латекса или раствора	ГОСТ Р 52239-2004
Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья	ГОСТ 5962-2013
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77

* Примечание: допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследований в соответствии с МУ 4.2.2831-11 «Лабораторная диагностика сапа», МУ 4.2.2787-10 «Лабораторная диагностика мелиоидоза» служат:

- пробы из суспензий выделенных культур возбудителей сапа и мелиоидоза или подозрительных изолятов;
- клинического (биологического) материала:
- на мелиоидоз – кровь, моча, спинномозговая жидкость, содержимое абсцессов, мокрота, рвотные массы, отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, мазок из носоглотки, испражнения, секционный материал (биоптаты печени, селезенки, легкого, сердца, почек, головного мозга), биологический материал от животных - кусочки органов трупов - сердце, печень, легкое, селезенка, почки, головной мозг, а также костный мозг,

кровь.

- на сап – кровь, моча, спинномозговая жидкость, содержимое абсцессов, мокрота, рвотные массы, отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, мазок из носоглотки, испражнения, секционный материал (биоптаты печени, селезенки, легкого, сердца, почек, головного мозга), биологический материал от животных - кусочки органов трупов - сердце, печень, легкое, селезенка, почки, головной мозг, костный мозг, кровь.
- пробы из объектов окружающей среды: вода, почва.
- пробы пищевых продуктов: твердые пищевые продукты (рис).

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично закрывающимися крышками в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». После проведения предварительной обработки проб допускается их транспортировка при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

7.1. Подготовка исследуемых образцов

7.1.1. Подготовка проб выделенных культур микроорганизмов

Колонии с плотной питательной среды, подозрительные на возбудителей сапа и мелиоидоза (не более 1-2 колоний), суспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида в микропробирке объемом 1,5 мл. Из чистых культур возбудителей сапа и мелиоидоза готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для *B. mallei*, *B. pseudomallei*. Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^3 м.к./мл. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают суспензии клеток чистой культуры в количестве 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

7.1.2. Подготовка проб клинического (биологического) материала

Кровь у людей берут из локтевой вены в количестве 4,5 мл с помощью одноразовой иглы (диаметр 0,8-1,1 мм) и специальной вакуумной системы типа «Vacuett» с ЭДТА или цитратом натрия, или стерильным шприцем в стерильные стеклянные или пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом. После центрифугирования отбирают лейкоцитарное кольцо вместе с плазмой. Хранят плазму крови при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 сут при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 месяца, при температуре не выше минус 68 °С – в течение 1 года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. При замораживании клинического материала его транспортировка должна проводиться также в замороженном состоянии. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают пробу в количестве 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Моча. При исследовании мочи собирают ее среднюю порцию (10-20 мл) в специальный одноразовый контейнер с закрывающейся крышкой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют в течение 10 мин при 10000 об/мин, полностью удаляют супернатант, не

захватывая осадок. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают содержимое на вортексе. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Спинномозговую жидкость отбирают после пункции поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл клинического материала. Для концентрирования клеток 1,0 мл спинномозговой жидкости центрифугируют в течение 10 мин при 10000 об/мин и исследуют осадок и 100 мкл надосадочной жидкости. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Для взятия **содержимого абсцессов** с поверхности раны удаляют поверхностный экссудат салфеткой, смоченной стерильным физиологическим раствором или 70 % спиртом. После дезинфекции поверхности раны и высыхания дезинфектанта с помощью шприца отбирают аспират из глубины раны. Если первоначально аспират взять не удалось, подкожно вводят стерильный физиологический раствор и повторно пытаются взять аспират. Отсасывают содержимое и переносят в стерильную пробирку объемом 1,5 мл с крышкой. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл клинического материала. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Мокроту забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и закручивающимися крышками объемом не менее 50 мл. Для разжижения мокроты применяют либо приготовленную ex tempore смесь NALC (N-ацетил-L-цистеина 0,25 г, 25 мл 4 % раствора NaOH, 25 мл 0,1 М тризамещенного натрия цитрата), либо раствор «Муколизин» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), (Na_2HPO_4 0,0774 М, NaH_2PO_4 0,0226 М, бетаМЭ 0,094 М, 5 % азид натрия в конечной концентрации 0,05 %). Пробу объемом 1-2 мл смешивают либо с равным объемом смеси NALC, либо с пятикратным объемом раствора «Муколизин». Пробы со смесью NALC перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 15 мин, периодически встряхивая. Затем разводят 0,067 М фосфатным буфером (рН 6,8) до конечного объема 50 мл. Пробу центрифугируют в течение 10 мин при 9000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробы с раствором «Муколизин» перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 20-30 мин, периодически встряхивая. Затем отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой и центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Рвотные массы в количестве 10-20 мл собирают в стерильную посуду ложками или автоматической пипеткой переменного объема. Дальнейшую подготовку проводят так же как при исследовании жидких испражнений. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, берут шприцем емкостью не менее 5 мл. Кожу на участке, намеченном для прокола, обрабатывают 70 % спиртом, а затем смазывают 5 % раствором йода и вновь протирают 70 % спиртом. У язв пунктируют плотный край. Материал переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл клинического материала. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК. Для концентрирования клеток 1,0 мл экссудата центрифугируют в течение 10 мин при 10000 об/мин и исследуют осадок и 100 мкл надосадочной жидкости. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Взятие мазка из носоглотки проводят натошак или не ранее, чем через 2-4 часа

после еды. Корень языка придавливают шпателем, материал берут стерильным зондом, не касаясь языка, слизистой полости рта, зубов, и помещают в пробирку с транспортной средой или 0,9% раствором натрия хлористого объемом 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Испражнения, если они жидкие забирают в количестве 10-20 мл в стерильную посуду объемом 60-100 мл стерильными ложками или автоматической пипеткой переменного объема, если они плотные - в количестве 1-2 г в стерильные емкости объемом 60-100 мл.

Жидкие испражнения переносят по 1-5 мл в микроцентрифужные пробирки с закручивающимися крышками. Пробирки центрифугируют при 9000 об/мин в течение 5 мин. Затем отбирают по 0,2 мл верхней бело-желтой части осадка (если отсутствует бело-желтый пограничный слой или полностью осадок, то отбор производят на границе осадка и супернатанта или со дна пробирки, соответственно) и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой. Пробирки центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

К плотным испражнениям добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого в соотношении 1:9, тщательно ресуспендируют с использованием микроцентрифуги-встряхивателя. Отбирают по 1 мл в микроцентрифужные пробирки. Дальнейшую подготовку проводят так же как при исследовании жидких испражнений. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Секционный материал (биоптаты печени, селезенки, легкого, сердца, почки, головной мозг) отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Для растирания кусочков органов используют либо стерильную ступку со стеклянным порошком либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной ступке со стеклянным порошком кусочки органов массой до 10 г растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (масса/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающимися крышками, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов массой 0,1-1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Подготовка проб органов лабораторных и диких животных

Органы лабораторных и диких животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки органов (сердце, печень, легкие, селезенка, почки, головной мозг), лимфотические узлы растирают с использованием либо стерильной ступки со стеклянным порошком либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной ступке со стеклянным порошком кусочки органов (сердце, печень, легкие, селезенка, почки, головной мозг) массой до 10 г, лимфотические узлы (целиком) растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (масса/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающимися крышками, используя

наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов и лимфотические узлы массой 0,1-1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Костный мозг получают путем пункции грудины шприцем с короткой и несколько затупленной иглой. Полученный костный мозг переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл клинического материала. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

7.1.3. Подготовка проб из объектов окружающей среды

Пробы **воды** с поверхности луж, рисовых полей, мелких водоемов и искусственных емкостей берутся из поверхностного слоя в объеме 50-100 мл в стерильные емкости объемом 200-250 мл с завинчивающейся крышкой. Для концентрирования бактериальных клеток используют либо дробное центрифугирование, либо вакуумную фильтрацию.

Для дробного центрифугирования пробы воды переносят по 22-35 мл в 2 (3) центрифужные пробирки с винтовой горловинной крышкой типа Falcon объемом 50 мл и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Осадок в каждой пробирке ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Из центрифужных пробирок переносят полученную суспензию в микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК исследуют осадок и 100 мкл надосадочной фракции. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Для вакуумной фильтрации используют стерильные фильтры с размером пор 0,45 мкм. В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный пластиковый пакет, например типа «Вихрь», объемом 100 мл, содержащий 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Фильтр внутри пакета растирают вручную в течение 1 мин, затем смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1,0 мл в микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Пробы **почвы** с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин при 5000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

7.1.4. Подготовка проб пищевых продуктов

Твердые пищевые продукты (рис) отбирают по 200 г и помещают в емкости с закрывающимися крышками. Из твердых продуктов берут навеску 25 г, добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость отбирают по 1 мл в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугируют в течение 2-3 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в отдельные микропробирки и центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение суток при температуре от 2 °С до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Для аутопсийного материала предусмотрены следующие режимы хранения: ткани внутренних органов хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре минус 70 °С.

7.2. Обеззараживание материала

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Дополнительно к исследуемым образцам готовят отрицательный контроль выделения (ОКВ). Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ТЕ-буфера.

К исследуемым образцам и ОКВ добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01%) с последующим прогреванием их при (56±1)°С в течение 30 минут. Затем к 100 мкл образцов, обработанных мертиолятом натрия и разлитых в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий буфер на основе 6 моль гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубируют 15 минут при температуре (65±1)°С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

7.3. Выделение ДНК

7.3.1 Выделение ДНК из проб чистых культур сапа, мелиоидоза и гетерологичных микроорганизмов, спинномозговой жидкости, мазок из носоглотки, осуществляют в присутствии гуанидинизотиоцианата методом осаждения изопропанолом с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкцией к набору.

7.3.2 Выделение ДНК из проб крови, мочи, мокроты, содержимого абсцессов, рвотных масс, отделяемое язв, экссудатов, пунктатов из лимфатических узлов, биоптатов, испражнений, воды, почвы, риса проводят с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкцией к набору.

Проведение ПЦР – амплификация ДНК

7.3.1. Подготовка ПКО ДНК *B. mallei* и ПКО ДНК *B. pseudomallei*

Перед началом работы с набором из морозильной камеры извлекают пробирки ПКО ДНК *B. mallei* и ПКО ДНК *B. pseudomallei*, выдерживают при комнатной температуре до размораживания реагентов, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок

пробирки.

7.3.2. Подготовка реакционной смеси

Из морозильной камеры извлекают ПЦР-смесь-1 *B.mallei/pseudomallei*, ПЦР-буфер-2, $MgCl_2$, ВКО, ТЕ-буфер и размораживают при комнатной температуре, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе, *Taq-F*-ДНК-полимеразу извлекают и держат на холоде, затем все реагенты центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с аэрозольным барьером с помощью дозаторов переменного объема.

Для проведения реакции отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл, соответствующее числу исследуемых проб, ОКВ, отрицательного контроля амплификации (Кпцр-) и положительных контролей (Кв.м.+, Кв.пс.+). Пробирки для «Rotor-Gene» подписывают сверху.

В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционную смесь из расчета, что на 1 реакцию необходимо (Таблица 3):

Таблица 3

Реагент	Объем, мкл
ПЦР-смесь-1 <i>B.mallei/pseudomallei</i>	5
ПЦР-буфер-2	5
$MgCl_2$	3
ВКО	1,5
<i>Taq-F</i> -ДНК-полимераза	0,5

Подготовленную смесь тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и вносят по 15 мкл подготовленной реакционной смеси в соответствующие микропробирки.

Затем в пробирки вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и 4 контрольных:

а) отрицательный контроль выделения (ОКВ) – вместо ДНК-пробы вносят 10 мкл образца, выделенного из пробы отрицательного контроля выделения.

б) отрицательный контроль ПЦР (Кпцр-) – вместо ДНК-пробы вносят 10 мкл ТЕ-буфера.

в) положительный контроль ПКО ДНК *B. mallei* (Кв.м.+) – вместо ДНК-пробы вносят 10 мкл образца положительного контроля ДНК *B. mallei*.

г) положительный контроль ПКО ДНК *B. pseudomallei* (Кв.пс.+) – вместо ДНК-пробы вносят 10 мкл образца положительного контроля ДНК *B. pseudomallei*.

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

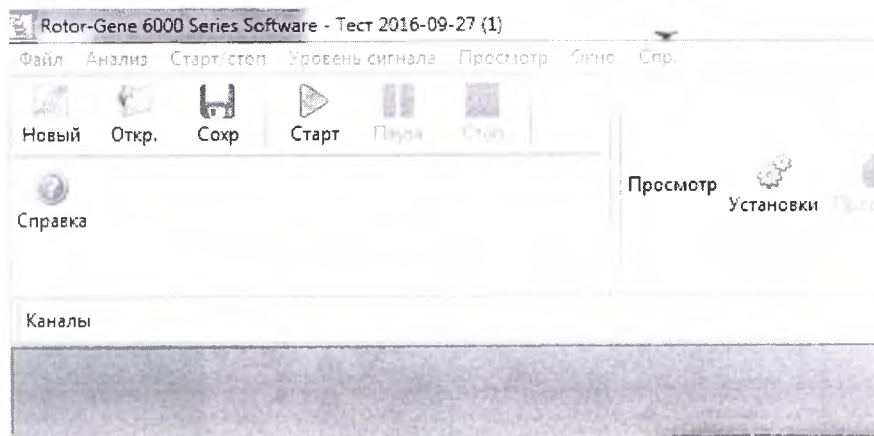
7.3.3. Проведение термоциклирования

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа «Rotor-Gene»

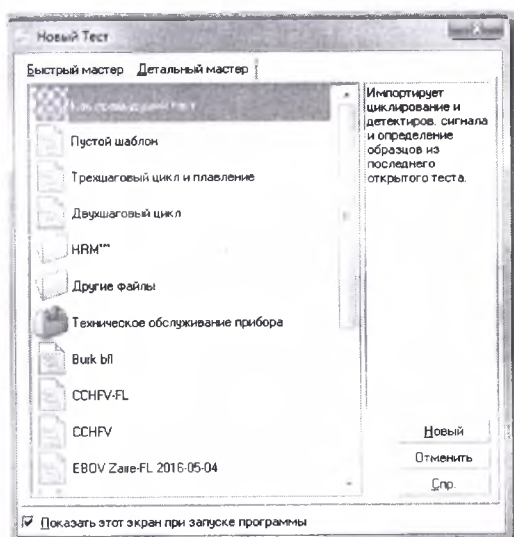
Программирование амплификатора типа Rotor-Gene:

Для работы с прибором прибором «Rotor-Gene» 6000 и «Rotor-Gene» Q следует использовать программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7 (build 67) или выше. При описании программы термины для каждой версии программы представлены следующим образом: для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажимают кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.

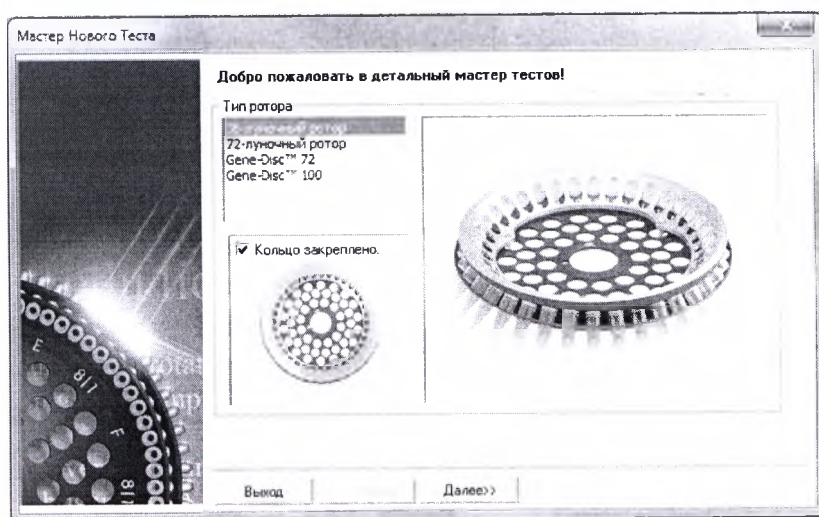


2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер». Нажимают кнопку «New»/«Новый».



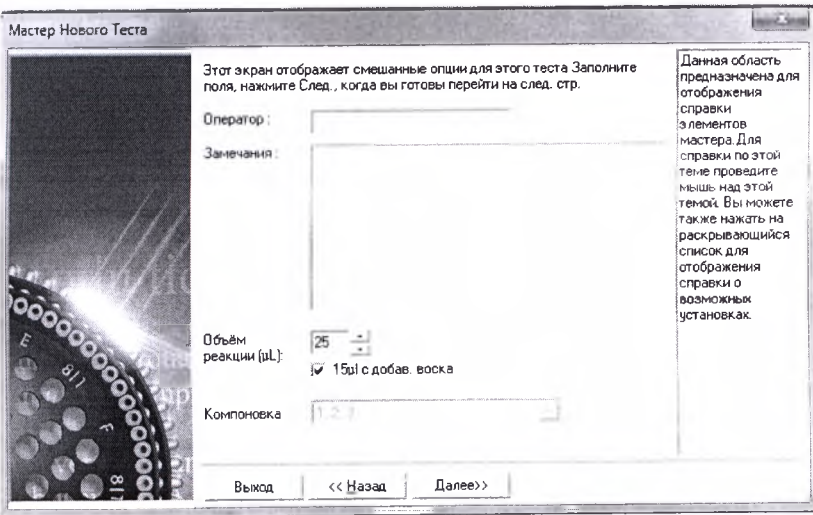
3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».

4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».

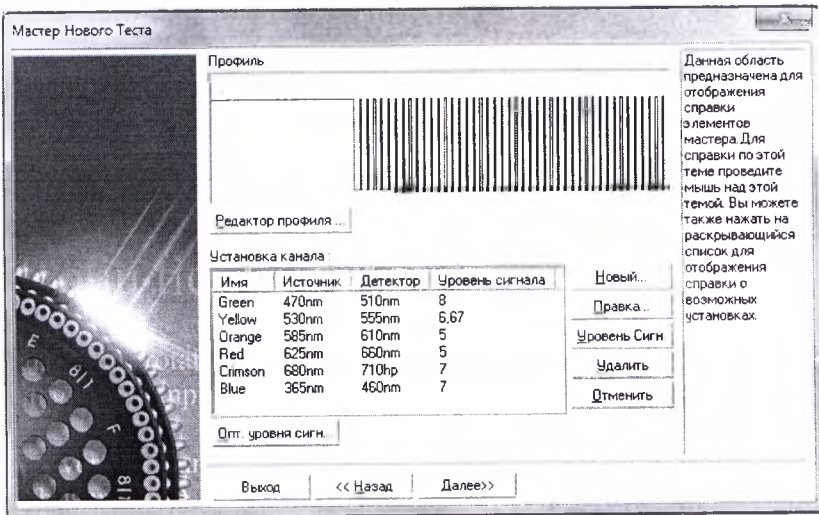


5. Выбирают объем реакционной смеси: «Reaction volume»/«Объем реакции» – 25 мкл.

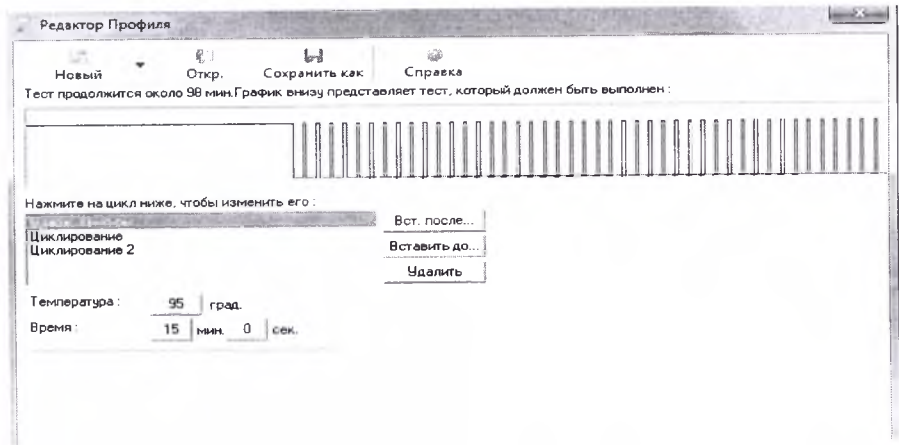
Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска».



6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».

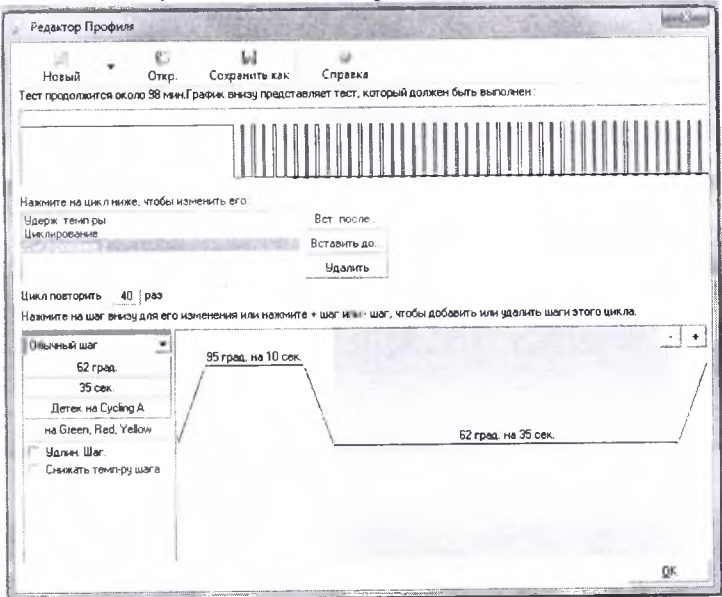


8. Задают следующие параметры эксперимента (Таблица 4):

Таблица 4

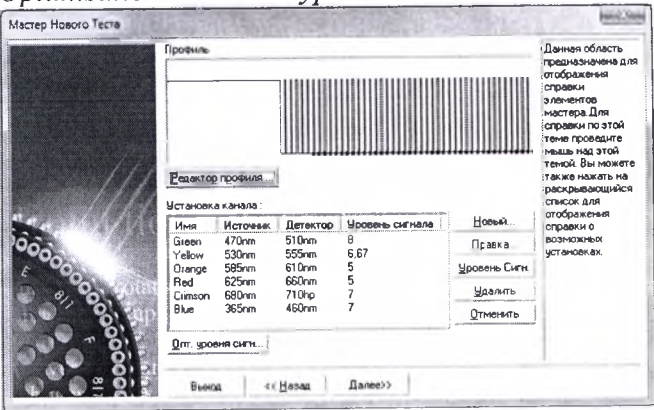
Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	10 с	-	5
	62	35 с	-	
3	95	10 с	-	40
	62	35 с	FAM/Green, JOE/Yellow, Cy5/Red	

Флуоресценцию измеряют при 62°C (во втором блоке циклирования) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, Cy5/Red

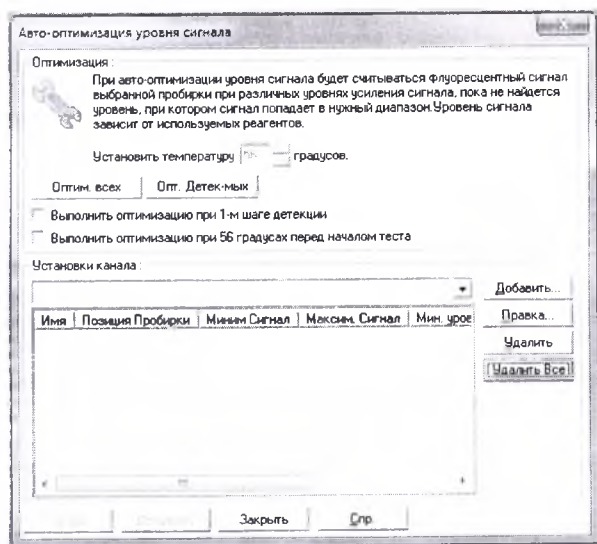


Нажимают кнопку «ОК»/«Да».

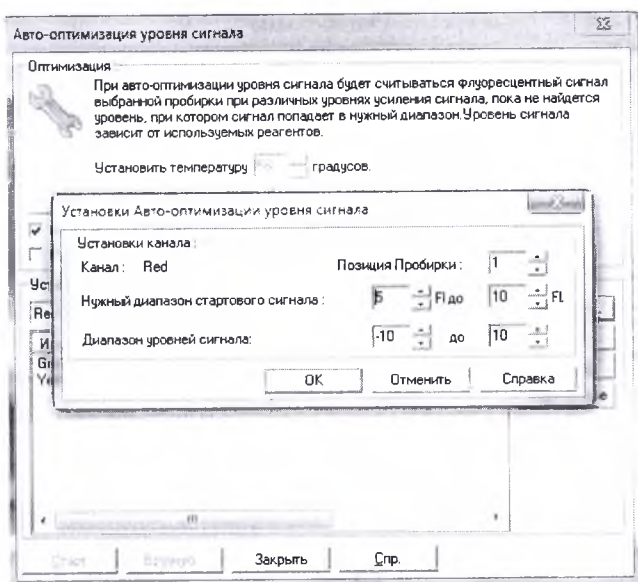
9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.».



В открывшемся окне нажимают кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых».

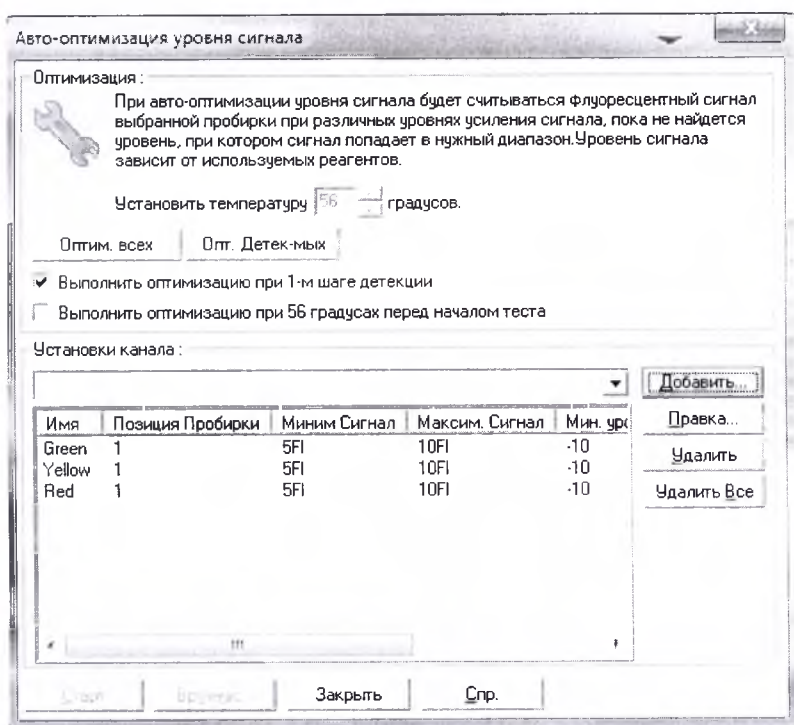


- для красителя **FAM/Green** указывают в графе «Min Reading»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «Max Reading»/«Максим. Сигнал» значение **10**,
- для красителя **JOE/Yellow** указывают в графе «Min Reading»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «Max Reading»/«Максим. Сигнал» значение **10**,
- для красителя **Cy5/Red** указывают в графе «Min Reading»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «Max Reading»/«Максим. Сигнал» значение **10**.

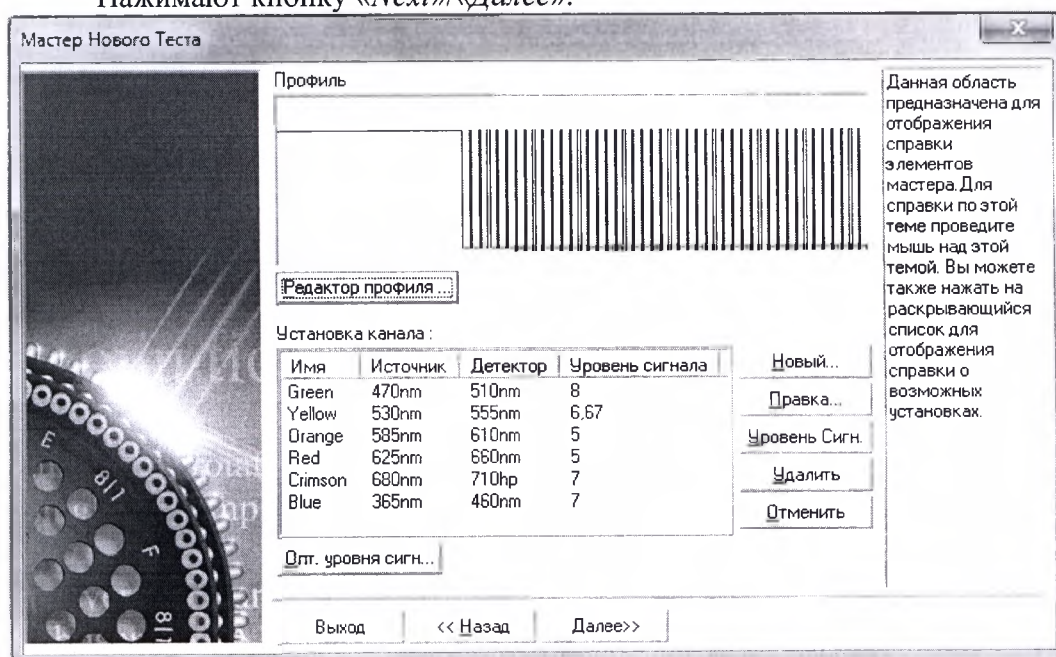


В графе «Tube position»/«Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с какой-либо исследуемой пробиркой с реакционной смесью.

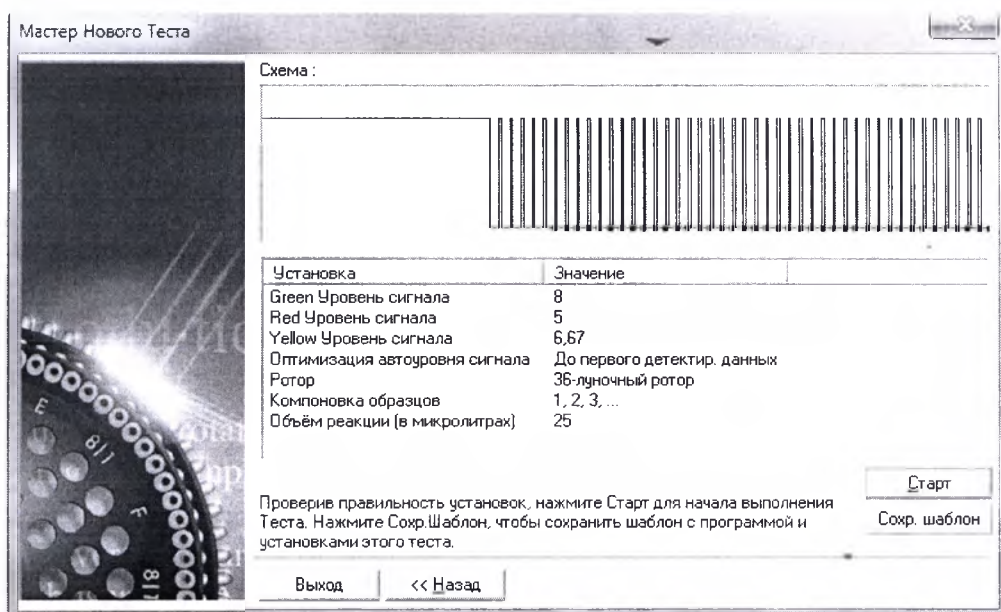
Помечают галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывают окно «Auto Gain Calibration Setup»/«Авто-оптимизация уровня сигнала», нажимают кнопку «Close»/«Закреть».



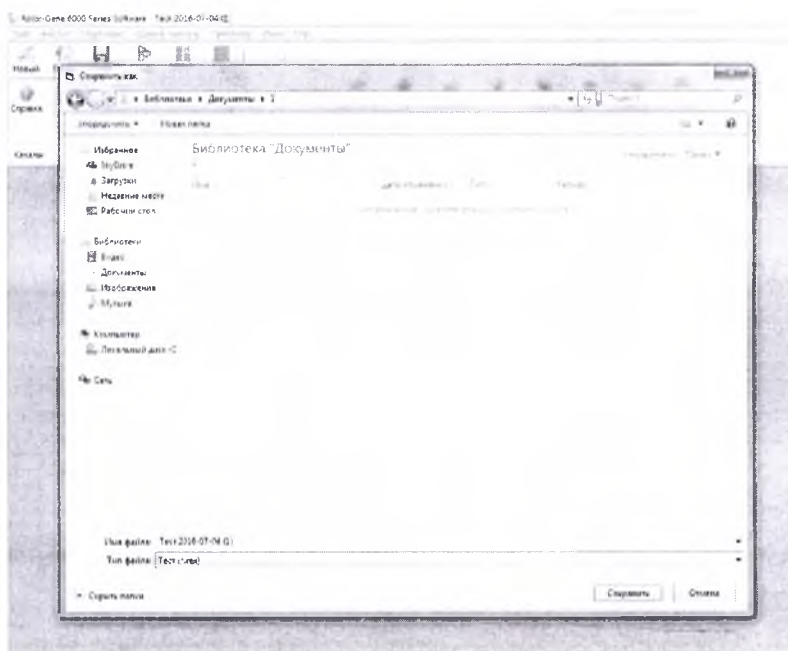
Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт». При необходимости введенные значения термоциклирования могут быть сохранены в качестве шаблона, используя кнопку «Save template/ «Сохранить шаблон».



11. Дают название эксперименту и сохраняют его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).



В процессе работы амплификатора или по окончании его работы программируют положение пробирок в карусели. Для этого используют кнопку «*Edit samples*»/«*Правка образцов*» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначают меню *Samples/Образцы* как *Unknown/Неизвестный*.

7.3.4. Анализ и учет результатов.

Регистрация результатов на приборах типа Rotor-Gene

Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Для регистрации результатов амплификации на приборах типа Rotor-Gene используют следующие показатели (Таблица 5).

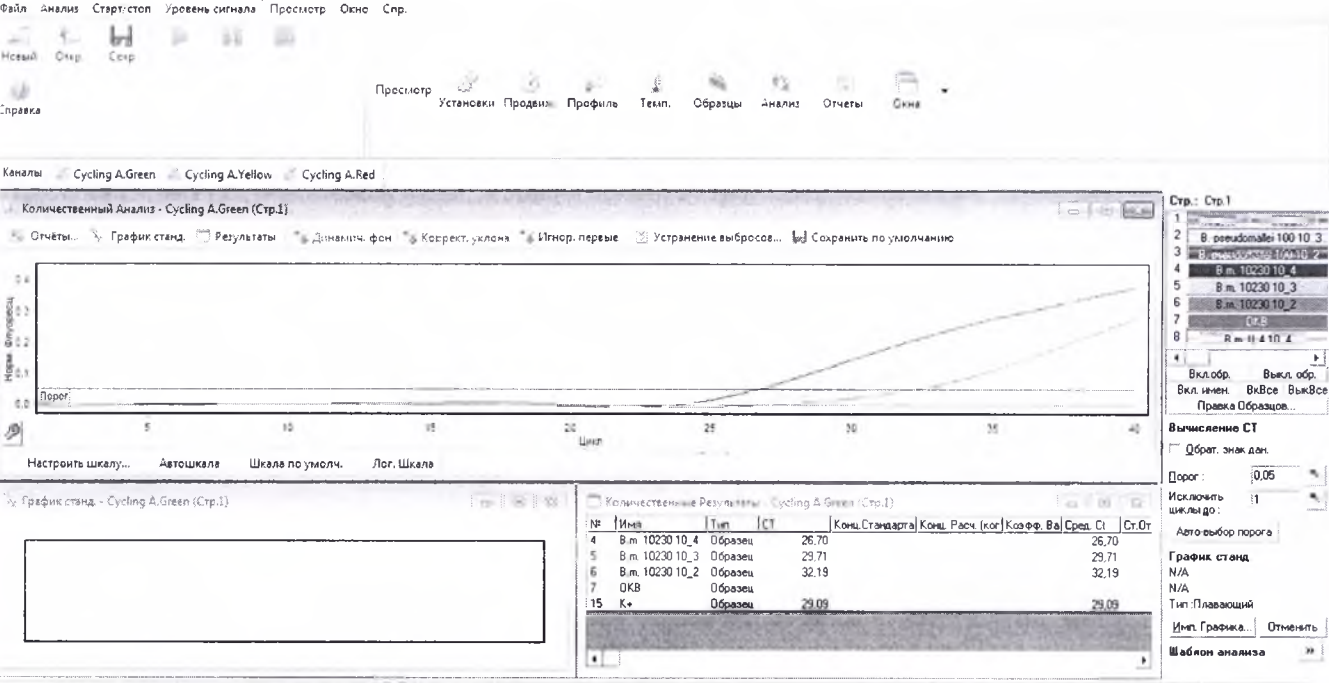
Таблица 5

Показатели	FAM Green	JOE Yellow	Cy5 Red
Наименование мишени	<i>B. mallei</i>	<i>B. pseudomallei</i>	<i>BKO</i>
Функция «Slope Correct»/«Коррек. уклона»	активна	активна	активна
Функция «More settings»/«Outlier Removal»/ «Устранение выбросов»	20 %	15 %	10 %
Значения Threshold/Порог	0,05	0,03	0,03

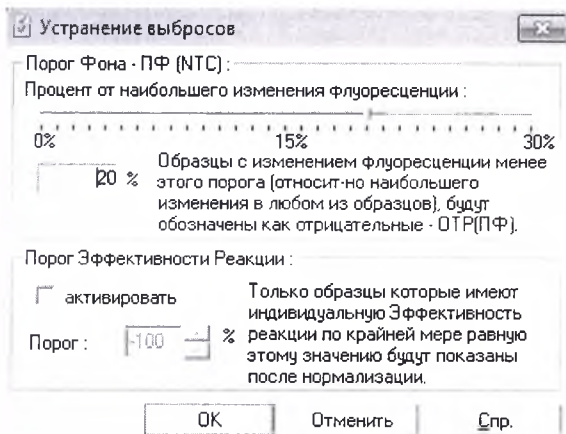
Примечание – в том случае, если кривые флуоресценции по каналу FAM/Green, JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту, устанавливают значение порога отрицательных проб NTC threshold/порог Фона - ПФ равным 25-30% по каналу FAM/Green и 20% - JOE/Yellow.

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green:

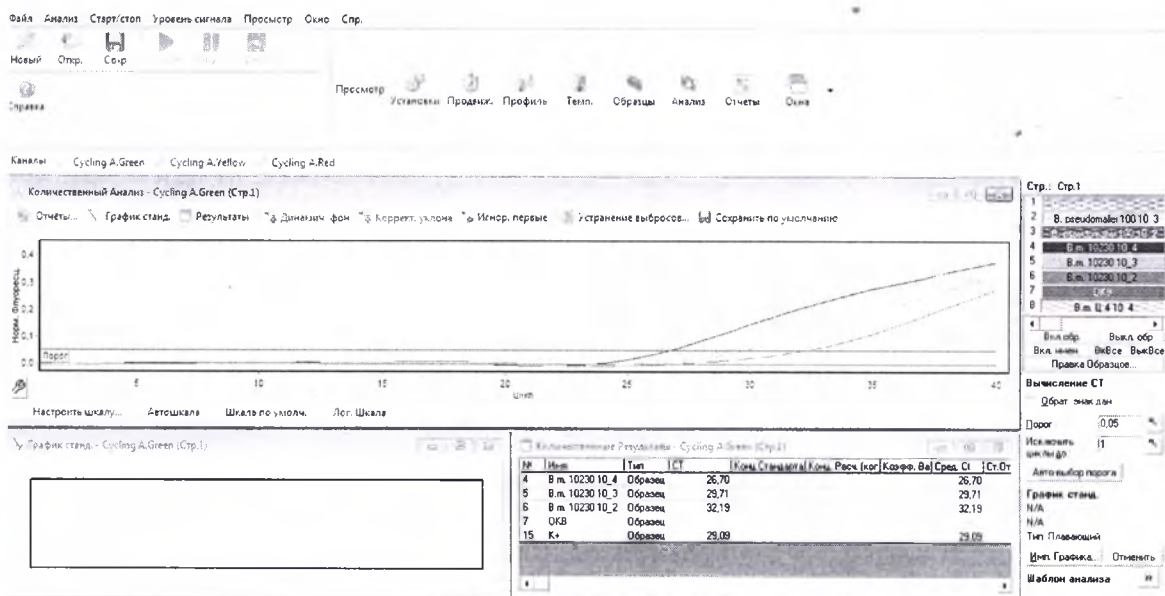
- 1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
- 2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
- 3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
- 4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку «Linear scale»/«Линейная шкала», в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).



- 5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливали значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %. В том случае, если кривая флуоресценции по каналу FAM/Green, не соответствуют экспоненциальному росту, устанавливают значение порога отрицательных проб NTC threshold/порог Фона- ПФ равным 25 – 30 %.



6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставить «Threshold»/«Порог» = **0,05**.



7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку *Linear scale*/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливали значение *NTC threshold*/Порог Фона – ПФ (NTC) – 15%. В том случае, если кривая флуоресценции по каналу JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту, устанавливают значение порога отрицательных проб *NTC threshold*/порог Фона - ПФ равным 20%.

- В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставить «Threshold»/«Порог» = 0,03.
- В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

- Регистрация результатов амплификации по каналу Cy5/Red:**
- Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. Cy5»/«Cycling A. Red», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
 - Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
 - В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
 - Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку «Linear scale»/«Линейная шкала», в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
 - В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение «NTC threshold»/«Порог Фона» – ПФ (NTC) – 10 %.
 - В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставить «Threshold»/«Порог» = 0,03.
 - В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).
- Пример регистрации и учета результатов на приборе типа «Rotor-Gene» представлен в приложении 1.

- 7.3.5. Учет результатов**
- Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).
- Вносят значения Ct полученные по каждому из каналов в бланк (приложение 2) и проводят учет и интерпретацию результатов в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительных (Кв.m.+ и Кв.ps.+) и отрицательных контролей (ОКВ и Кпцр-) и таблицы интерпретации данных анализа с использованием на приборах типа «Rotor-Gene».
- К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительных (Кв.m.+ и Кв.ps.+) и отрицательных (ОКВ и Кпцр-) контролей амплификации (Таблица 6).

Таблица 6

Контро- ли	Контроли- руемый этап ПЦР- исследова- ния	Значение порогового цикла (Ct) по каналу			Результат
		FAM/ Green	JOE/Yellow	Cy5/Red	
		детекция B. mallei	детекция B. pseudomallei	детекция ВКО	
ОКВ	Экстракция ДНК	«—»	«—»	< 33	отрицательный
Кпцр(-)	ПЦР	«—»	«—»	< 33	отрицательный
Кв.ps.(+)	ПЦР	«—»	< 33	< 33	положительный
Кв.m.(+)	ПЦР	< 33	«—»	< 33	положительный

- Принцип интерпритации результатов следующий (Таблица 7):
- Образец считается положительным и содержит ДНК *B. mallei*, если в таблице результатов (пороговых циклов) по каналу *FAM/Green* для него определено значение

порогового цикла $Ct < 33$, по каналу *JOE/Yellow* отсутствует значение Ct и по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла Ct .

- Образец считается положительным и содержит ДНК *B. pseudomallei*, если в таблице результатов (пороговых циклов) по каналу *JOE/Yellow* для него определено значение порогового цикла $Ct < 33$, а по каналу *FAM/Green* - значение Ct отсутствует или $Ct > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла Ct .

- Образец считается отрицательным, если в таблице результатов (пороговых циклов) по каналу *FAM/Green* для него не определено значение (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или $Ct > 33$, по каналу *JOE/Yellow* для него не определено значение (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), по каналу *Cy5/Red* для него определено значение Ct , не превышающее 33.

Образцы, для которых по каналу *FAM/Green* отсутствует или определено значение порогового цикла $Ct > 33$, по каналу *JOE/Yellow* отсутствует или определено значение порогового цикла $Ct > 33$, а по каналу *Cy5/Red* - значение порогового цикла отсутствует или превышает $Ct > 33$, результат анализа считают невалидным, требуется повторное проведение ПЦР.

Если при повторном исследовании получены значения Ct не более 33 по каналам *FAM/Green* и *Cy5/Red*, при отрицательном значении по каналу *JOE/Yellow*, результат считают положительным на наличие *B. mallei*; если получены значения Ct не более 33 по каналам *JOE/Yellow* и *Cy5/Red*, при отрицательном значении порогового цикла или $Ct > 33$ по каналу *FAM/Green*, результат считают положительным на наличие *B. pseudomallei*. При повторном получении значения Ct более 33 по всем каналам требуется повторить весь анализ, начиная с этапа подготовки проб.

Таблица 7

Интерпретация данных анализа на приборах типа «Rotor-Gene»

Проба	Значение порогового цикла (Ct) по каналу			Результат анализа / вид возбудителя в пробе
	FAM/ Green	JOE/ Yellow	Cy5/ Red	
	детекция <i>B. mallei</i>	детекция <i>B. pseudomallei</i>	детекция ВКО	
Исследуемые пробы	«—» или $Ct > 33$	< 33	определено или отсутствует	Положительный/ обнаружена ДНК <i>B. pseudomallei</i>
	< 33	«—»	определено или отсутствует	Положительный/ обнаружена ДНК <i>B. mallei</i>
	«—» или $Ct > 33$	«—»	< 33	Отрицательный/ не обнаружена ДНК штаммов <i>B. mallei</i> и <i>B. pseudomallei</i>
	При значении Ct по одному или нескольким каналам			
	«—»	«—»	отсутствует или > 33	Результат невалидный. Необходимо повторить исследование.
	$Ct > 33$	$Ct > 33$	отсутствует или > 33	Результат невалидный. Необходимо повторить исследование

Пример интерпретации результатов анализа на приборе типа «Rotor-Gene» представлены в приложении 1.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 21.20.23-013-01898084-2016 условия хранения компонентов набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB»: ПЦР-смесь-1 *B. mallei/pseudomallei*, ПЦР-буфер-2, $MgCl_2$, *Taq-F*-ДНК-полимераза, ВКО, ПКО ДНК *B. mallei*, ПКО ДНК *B. pseudomallei*, ТЕ-буфер – при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С. ПЦР-смесь-1 *B. mallei/pseudomallei* хранить в защищенном от света месте.

8.2. Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» осуществляют всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями ГОСТ 15150 и правилами, установленными для каждого вида транспорта. Условия транспортирования - при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С – неограниченно.

8.3. Срок годности набора

Срок годности набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» – 9 месяцев. Срок годности ПКО ДНК *B. mallei*, ПКО ДНК *B. pseudomallei* – 9 месяцев при хранении при температуре от минус 16 до минус 20 °С.

Условия эксплуатации набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» – при температуре от 18 до 25 °С.

8.4. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

Производитель - Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) (400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел. (8442) 37-37-74).

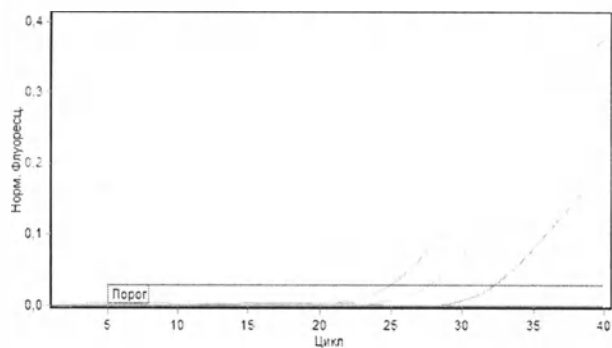
Директор ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора академик РАН, д.м.н., профессор



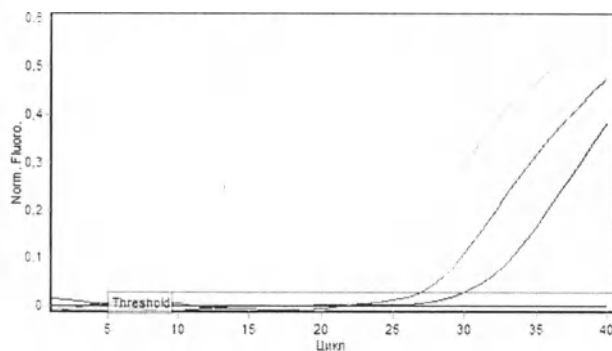
В.В. Кутырев

Пример регистрации, учета и интерпретации результатов с использованием набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB»

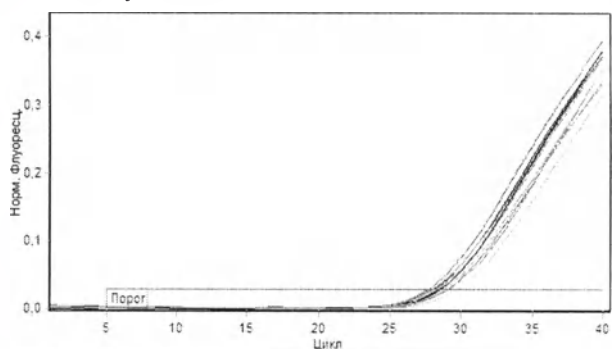
Канал FAM



Канал JOE



Канал Cy5



Проба	Значение порогового цикла (Ct) по каналу			Интерпретация результата
	FAM/ Green	JOE/ Yellow	Cy5/ Red	
	детекция <i>B. mallei</i>	детекция <i>B. pseudomallei</i>	детекция <i>BKO</i>	
1	—	30,09	28,01	Положительный/ обнаружена ДНК <i>B. pseudomallei</i>
2	—	26,97	28,10	Положительный/ обнаружена ДНК <i>B. pseudomallei</i>
3	—	—	28,49	Отрицательный/ не обнаружена ДНК штаммов <i>B. mallei</i> и <i>B. pseudomallei</i>
4	32,19	—	29,04	Положительный/ обнаружена ДНК <i>B. mallei</i>
5	27,79	—	28,01	Положительный/ обнаружена ДНК <i>B. mallei</i>
6	—	—	27,73	Отрицательный/ не обнаружена ДНК штаммов <i>B. mallei</i> и <i>B. pseudomallei</i>
ОКВ	—	—	29,09	☐ - результаты подлежат учету
Кпцр-	—	—	28,23	☐ - результаты подлежат учету
К <i>B.m.</i> +	25,05	—	28,55	☐ - результаты подлежат учету
К <i>B.ps.</i> +	—	23,39	28,81	☐ - результаты подлежат учету

Бланк учета результатов с использованием
набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB»

Проба	FAM	JOE	Cy5	Интерпретация результата
	<i>B. mallei</i>	<i>B. pseudomallei</i>	ВКО	
1				
2				
3				
4				
5				
ОКВ				☐ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету
Кпцр-				☐ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету
КВ.м.+				☐ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету
КВ.ps.+				☐ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету

Прошито и пронумеровано

26/04/2018 истов(а)

Зав. отд. дел. производства

Чернова Е. А.

Подпись

