

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Топорков А.В.

« 12 » 09 2018 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ*

«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ БУРКХОЛЬДЕРИЙ ГРУППЫ «PSEUDOMALLEI» В ФОРМАТЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ «АМПЛИГЕН БУРКХОЛЬДЕРИИ ГРУППЫ «PSEUDOMALLEI» BL B/D - EPH» ПО ТУ 21.20.23-014-01898084-2016»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» BL B/D - EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016», далее – набор реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» BL B/D - EPh», предназначен для обнаружения ДНК и одновременной дифференциации 3-х видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» - возбудителя мелиоидоза (*B. pseudomallei*), возбудителя сапа (*B. mallei*) и *B. thailandensis* по набору генов β-лактамаз молекулярных классов В и D в пробах выделенных культур микроорганизмов, клинического материала (кровь, моча, мокрота, спинномозговая жидкость, отделяемое язв, пунктаты из лимфатических узлов, экссудаты, абсцессы, рвотные массы, испражнения), секционного материала (биоптаты печени, селезенки, легкого, сердца, почки, головной мозг) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим способом детекции.

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

Мелиоидоз - инфекционное заболевание людей и животных, не имеющее специфических симптомов и протекающее с явлениями сепсиса и образованием абсцессов в органах и тканях, эндемичен для широкого ряда стран влажных тропиков и субтропиков. Инфицированные животные, выделяя возбудителя с естественными жидкостями и экссудатом раневых поверхностей, обсеменяют объекты окружающей среды. Основным механизмом заражения человека - контактный, реализуется при контакте поврежденной кожи или слизистых оболочек с инфицированными почвой и водой. Встречается алиментарный путь заражения, в том числе с грудным молоком; наиболее опасно аэрогенное заражение, которое ведет, как правило, к летальному исходу.

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

*Введена впервые

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.

B. thailandensis – представитель комплекса «*B. pseudomallei*», относится к микроорганизмам III группы патогенности (опасности), способен вызывать инфекции различной степени тяжести с неспецифическими клиническими проявлениями, что в значительной мере затрудняет его дифференциальную диагностику с мелиоидозом. *B. thailandensis* разделяет с *B. pseudomallei* естественные среды обитания. Заражение человека чаще всего происходит через поврежденные кожные покровы и слизистые оболочки путем попадания *B. thailandensis* с инфицированной почвой или водой. В большинстве обычных диагностических тестов *B. thailandensis* идентичен *B. pseudomallei*, что затрудняет его дифференциацию с возбудителями сапа и мелиоидоза рутинными лабораторными методами. В связи с чем решающую роль в лабораторной диагностике трех перечисленных инфекций играют молекулярно-генетические методы (ПЦР).

Набор реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh» используется в клинической лабораторной диагностике для исследования материала, полученного от лиц обоего пола, любого возраста с подозрением на мелиоидоз и/или сап, *B. thailandensis* вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания (в анамнезе находившихся на эндемичных территориях по мелиоидозу, сапу и *B. thailandensis*).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Для проведения исследований могут быть использованы амплификаторы для ПЦР типа С1000.

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh» входят 7 реагентов:

Таблица 1

№ п/п	Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
1	ПЦР - смесь № 1	Прозрачная жидкость красного цвета, содержащая ПЦР-буфер, магния хлорид и смесь дНТФ	0,5	1 пробирка
2	ПЦР - смесь № 2	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая смесь праймеров	0,1	1 пробирка
3	Taq-ДНК-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,02	1 пробирка
4	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость, водный раствор геномной ДНК <i>B. pseudomallei</i> C-141	0,4	1 пробирка
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
6	Вода деионизованная	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
7	Масло минеральное	Прозрачная вязкая жидкость	1,0	2 пробирки

Набор реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh» рассчитан на проведение 50 определений, включая положительные и отрицательные контроли.

Принцип метода – обнаружение специфических фрагментов ДНК у *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* основан на использовании мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим способом детекции. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) представляет собой повторяющиеся циклы синтеза – амплификации, специфической области ДНК-мишени в присутствии полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень. Одна пара группоспецифических праймеров обеспечивает амплификацию фрагмента гена β -лактамазы класса В у *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*. Вторая пара группоспецифических праймеров обеспечивает амплификацию фрагмента гена β -лактамазы класса В у *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Третья пара группоспецифических праймеров обеспечивает амплификацию фрагмента гена β -лактамазы класса D у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*. Детекцию продуктов амплификации осуществляют с помощью электрофореза в агарозном геле. Метод мультиплексной ПЦР является качественным анализом.

Проведение анализа включает следующие этапы: 1. выделение ДНК из проб выделенных культур микроорганизмов, клинического и секционного материала; 2. проведение ПЦР – амплификация ДНК на приборах типа С1000; 3. поста-новка гель-электрофореза; 4. учёт и интерпретация результатов ПЦР-анализа проводят по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических фрагментов ДНК в срав-нение с «положительным контролем».

Ограничение метода. В инфицированном материале *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* может быть не обнаружена вследствие содержания инфекционного агента в образце ниже заявленной чувствительности или по причине некачественного выделения ДНК. Гепарин, цитрат натрия являются ингибиторами ПЦР, поэтому в качестве антикоагулянта можно использовать только ЭДТА 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». Также ингибитором ПЦР являются следовые количества гемоглобина в препарате выделенной ДНК. Для избегания ошибок на этапе выделения ДНК следует использовать рекомендуемый метод выделения ДНК в строгом соответствии с инструкцией производителя по применению набора для выделения ДНК. Причиной получения ложноположительного результата может служить контаминация на этапе постановки реакции ПЦР. Ошибки проведения исследования выявляются с помощью положительного и отрицательного контрольных образцов и ПЦР (п.п. 7.2.3, 7.2.5).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Аналитическая чувствительность

Набор реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» β L B/D - EPh» должен выявлять ДНК *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* в суспензиях концентрацией не менее 1×10^4 м.к./мл и дифференцировать виды буркхольдерий группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*) по набору генов β -лактамаз молекулярных классов В и D.

Аналитическая специфичность

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

Диагностические характеристики

Диагностические характеристики набора установлены в лабораторных условиях с применением 15 штаммов *B. pseudomallei*, 13 штаммов *B. mallei*, 5 штаммов *B. thailandensis* и 24 штаммов гетерологичных микроорганизмов из лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора на модельных образцах материала: 162 пробы бактериальных суспензий буркхольдерий группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*) в концентрации 1×10^4 м.к./мл, 108 проб клинического материала, искусственно контаминированных буркхольдериями группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*) в концентрации 1×10^4 м.к./мл, 66 проб секционного материала, искусственно контаминированных буркхольдериями группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*) в концентрации 1×10^4 м.к./мл; 156 проб, контаминированных близкородственными и гетерологичными микроорганизмами (*B. cepacia*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae*) в концентрации 1×10^7 м.к./мл.

Определение буркхольдериями группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*), близкородственных и гетерологичных микроорганизмов подтверждено с использованием референтного метода - микробиологический метод исследования микроорганизмов рода *Burkholderia* с идентификацией буркхольдерий группы «*pseudomallei*» на основании роста на дифференциально-диагностических средах (агар Эшдауна, триптиказо-соевый агар с 4 % глицерина, минимальный агар с L-арабинозой).

Диагностическая чувствительность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 % при анализе 336 положительных проб (162 пробы суспензий микроорганизмов, 108 проб клинического материала и 66 проб секционного материала, искусственно контаминированных бактериальными агентами), содержащих буркхольдерии группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*) в концентрации 1×10^4 м.к./мл получен положительный результат в 306 случаях.

Диагностическая специфичность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 %; при исследовании 156 отрицательных проб (98 проб суспензий микроорганизмов, 36 проб клинического материала и 22 пробы секционного материала, искусственно контаминированных бактериальными агентами), содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы (*Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*) в концентрации 1×10^7 м.к./мл получен отрицательный ответ в 156 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 образованием. Инструкция по применению «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh» Страница 4 из 13

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 наборов реагентов, не прошедших контроль, а также серий с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиНом 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 Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* β L B/D - EPh» 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 C1000	Термоциклер C1000, «Bio-Rad», США
Шкаф микробиологической безопасности класса II	Шкаф биологической безопасности II класса GL-130 Biowizard Golden Line, «KOJAIR», Финляндия
ПЦР-бокс	Бокс для ПЦР работ UVC/T-M-AR, «BioSan»,

Инструкция по применению «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* β L B/D - EPh» Страница 5 из 13

	Латвия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 120 °С, «ТЕРМО 48», «Биоком», Россия
Микроцентрифуга-вортекс	Центрифуга «Фуга/вортекс микро-спин FV-2400», «BioSan», Латвия
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга «Mini-Spin», «Eppendorf», Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский «ОМ-1», ОАО «Утес», Россия
Дозатор 0,5 – 10 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 5 – 50 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 20 – 200 мкл	ILS (CAPP), Дания
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 6×12 мест, «ИнтерЛабСервис», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл, 10×20 мест, «ИнтерЛабСервис», Россия
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892, «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892, «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 20 мкл	ФСЗ 2012/11892, «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892, «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892, «Axygen», США
Пестик для пробирок типа Eppendorf 1,5-2,0 мл	ФСЗ 2011/10287, «SSI», США
Камера для горизонтального электрофореза	Камера для горизонтального электрофореза multiSUB Midi Duo (10×7 + 10×10 см), «Cleaver Scientific», Великобритания
Источник питания	Источник питания EV243, «Consort», Бельгия
Система геледокументирующая	Система геледокументирующая GelDoc, «Bio-Rad», США
Холодильник	Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 18 °С, «Атлант», 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

Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб», вариант 100 по ТУ 9398-004-01897593-2008	ФСР 2008/03993, ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия
Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ», вариант генотип-300 по ТУ 9398-070-01897593-2008	ФСР 2008/03146, ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия

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

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследования служат:

- пробы чистых культур микроорганизмов: бактериальные суспензии культур *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* или подозрительных изолятов;
- пробы биологического (клинического) материала:
 - на мелиоидоз (*B. pseudomallei*) – кровь, моча, мокрота, спинномозговая жидкость, отделяемое язв, пунктаты лимфоузлов, экссудаты, абсцессы, рвотные массы, секционный материал (печень, селезенка, легкие, сердце, почки, головной мозг);
 - на сап (*B. mallei*) – мокрота, отделяемое язв, пунктаты лимфоузлов, экссудаты, испражнения, секционный материал (печень, селезенка, легкое, сердце);
 - на *B. thailandensis* - секционный материал (печень, селезенка, легкие, сердце, почки, головной мозг).

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично завинчивающимися 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 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 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 чистых культур микроорганизмов для ПЦР

Из культур *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* или подозрительных изолятов готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85 (10МЕ)), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*. 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. 7.2.1, 7.2.2).

7.1.2. Подготовка проб биологического (клинического) материала

Кровь. 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 6 % ЭДТА или одноразовым 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. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают пробу в количестве 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2.1, 7.2.2).

Моча. При исследовании мочи собирают ее среднюю порцию (20-30 мл) в специальный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую микроцентрифужную пробирку 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. 7.2.1, 7.2.2).

Мокрота. Мокроту забирают в количестве не менее 1 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл. Для разжижения мокроты применяют раствор «Муколизин» (Na_2HPO_4 0,0774 М, NaH_2PO_4 0,0226 М, бета-МЭ 0,094 М, 5 % азид натрия в конечной концентрации 0,05 %). Пробу объемом 1-2 мл смешивают с пятикратным объемом раствора «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 и центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. Удаляют супернатант, не захватывая осадок. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2.1, 7.2.2).

Спинномозговую жидкость (ликвор) отбирают после пункции поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков с помощью одноразовых игл в одноразовые пластиковые сухие микропробирки объемом 1,5 мл в количестве не менее 1 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. Для концентрирования клеток 1 мл спинномозговой жидкости центрифугируют в течение 10 мин при 10000 об/мин. Удаляют 0,9 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,1 мл оставшейся жидкости. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2.1, 7.2.2).

Отделяемое язв, пунктаты из лимфатических узлов, экссудаты 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 (пп. 7.2.1, 7.2.2).

Для концентрирования клеток 1 мл экссудата центрифугируют в течение 10 мин при 10000 об/мин. Удаляют 0,9 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,1 мл оставшейся жидкости. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2.1, 7.2.2).

Абсцессы. 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 микропробирку 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. 7.2.1, 7.2.2).

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. 7.2.1, 7.2.2).

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 1-3 г в стерильные емкости объемом 60-100 мл.

Жидкие испражнения переносят по 1-5 мл в микроцентрифужные пробирки с завинчивающимися 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. Пробирки центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 мин. Удаляют супернатант, не захватывая осадок. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2.1, 7.2.2).

К плотным испражнениям добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:9, тщательно ресуспендируют с использованием микроцентрифуги-встряхивателя. Отбирают по 1 мл в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Дальнейшую подготовку проводят так же как при исследовании жидких испражнений. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2.1, 7.2.2).

Секционный материал (биоптаты печени, селезенки, легкого, сердца, почки, головной мозг) отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки органов массой 0,1-1 г растирают в микропробирках объемом 1,5 мл 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 (не захватывая осадок) в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2.1, 7.2.2).

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.2.1 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».

К исследуемым образцам добавляют мертиолят натрия до концентрации 1:10000 (0,01 %) и прогревают их при $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Затем, 100 мкл образца переносят

в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий буфер, на основе 6 М гуанидинизотиоцианата, в объеме указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубируют 15 минут при температуре $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

7.2.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют методом аффинной сорбции на частицах силикагеля с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) или аналогичный. Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к указанному набору.

7.2.3 Проведение ПЦР – амплификация ДНК

7.2.3.1 Разведение препарата ДНК (при необходимости)

Для выявления и идентификации ДНК возбудителей сапа, мелиоидоза и *B. thailandensis* необходимо внести в реакцию 8 мкл препарата ДНК. В случае необходимости, раствор препарата ДНК разводят с помощью деионизованной воды. При исследовании чистых культур микроорганизмов, препараты ДНК, выделенные из 100 мкл бактериальной суспензии с концентрацией 1×10^9 м.к./мл, разводят в соотношении 1 часть раствора ДНК и 1 часть деионизованной воды.

7.2.3.2 Подготовка реакционной смеси

Общий объем реакционной смеси – 20 мкл, включая объем ДНК-пробы – 8 мкл.

Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с аэрозольным барьером с помощью дозаторов переменного объема.

1. ПЦР - смесь № 1, ПЦР - смесь № 2, *Taq*-ДНК-полимеразу, ПКО и ОКО извлекают из морозильной камеры и размораживают при комнатной температуре ($18-25^\circ\text{C}$). Перемешивают содержимое пробирок и осаждают капли кратковременным центрифугированием с помощью микроцентрифуги-вортекс.

2. Отбирают необходимое количество микропробирок для постановки реакции амплификации (количество исследуемых проб (N) + 2 контрольных образца (ПКО, ОКО)). Маркируют пробирки.

3. В отдельной пробирке готовят реакционную смесь. Смешивают необходимое количество ПЦР - смеси № 1, ПЦР - смеси № 2, *Taq*-ДНК-полимеразы согласно таблице 3.

Таблица 3

Компоненты реакционной смеси	Объем, мкл в расчете на одну реакцию	Количество исследуемых проб (N+2)	Объем, мкл в расчете на количество проб (N+2)
ПЦР - смеси № 1	10		
ПЦР - смеси № 2	2		
<i>Taq</i> -ДНК-полимераза	0,25		
Общий объем	12		

4. Перемешивают содержимое пробирки и осаждают капли кратковременным центрифугированием с помощью микроцентрифуги-вортекс.

5. В маркированные пробирки вносят по 12 мкл готовой реакционной смеси.

6. В пробирки с реакционной смесью вносят по 8 мкл ДНК-пробы.

7. Ставят контроли амплификации:

- а) отрицательный контроль ПЦР – вместо ДНК-пробы вносят 8 мкл ОКО;
 б) положительный контроль ПЦР – вместо ДНК-пробы вносят 8 мкл ПКО.

8. Перемешивают содержимое микропробирок и для избавления от микропузырьков кратковременно центрифугируют с помощью микроцентрифуги-вортекса.

9. При необходимости для предотвращения испарения реакционной смеси при термоциклировании сверху во все микропробирки добавляют по 25 мкл минерального масла.

7.2.3.3 Проведение реакции амплификации

Микропробирки устанавливают в ячейки реакционного модуля амплификатора типа С1000.

Программируют прибор и запускают выполнение программы амплификации согласно таблице 4.

Таблица 4

Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95,0	5 мин	1
2	94,0	30 с	35
	59,9	30 с	
	72,0	45 с	
3	72,0	1 мин	1

По окончании выполнения программы приступают к анализу и интерпретации результатов.

7.2.4 Постановка гель-электрофореза

Анализ продуктов амплификации проводят разделением фрагментов ДНК в агарозном геле, используя коммерческий набор Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ», вариант генотип-300 (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия). Рабочие растворы и агарозный гель готовят в соответствии с инструкцией к указанному набору.

После окончания реакции амплификации пробирки с продуктами ПЦР выставляют в штатив последовательно, отбирают из-под слоя масла по 10 мкл проб и вносят в лунки геля под буферный раствор для электрофореза (используют новый наконечник для каждой пробы). В каждом ряду дорожек геля обязательно должен быть представлен «положительный контроль» и «отрицательный контроль».

Подключают камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включают источник. Для проведения электрофореза используют камеру multiSUB Midi Duo («Cleaver Scientific», Великобритания) и источник питания EV243 («Consort», Бельгия) или аналогичные. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 5 В/см. Время электрофореза – 40 мин.

По завершении времени электрофореза, выключают источник тока, агарозный гель извлекают из камеры и результаты проведения ПЦР регистрируют в проходящем ультрафиолете с использованием системы документации гелей «Gel Doc» («BioRad», США) или аналогичной.

7.2.5 Учет и интерпретация результатов

Учёт и интерпретацию результатов ПЦР-анализа проводят по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических фрагментов ДНК в сравнение с «положительным контролем» (таблица 5, рис. 1, рис. 2, рис. 3).

Инструкция по применению «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* BL B/D - EPh» Страница 11 из 13

Таблица 5

Результат анализа/ вид возбудителя в пробе	Длина специфического фрагмента ДНК на электрофореграмме		
	727 п.н.	440 п.н.	352 п.н.
Положительный/обнаружена ДНК <i>B. pseudomallei</i>	+	+	+
Положительный/обнаружена ДНК <i>B. mallei</i>	+	-	+
Положительный/обнаружена ДНК <i>B. thailandensis</i>	-	+	+
Отрицательный/не обнаружена ДНК штаммов <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. mallei</i> и <i>B. thailandensis</i>	-	-	-
«Положительный контроль»	+	+	+
«Отрицательный контроль»	-	-	-

Рис. 1

Электрофореграмма результатов ПЦР при исследовании проб

1. ОКО
2. ПКО
3. Обнаружена ДНК *B. pseudomallei*



Рис. 2

Электрофореграмма результатов ПЦР при исследовании проб

1. ОКО
2. ПКО
3. Обнаружена ДНК *B. mallei*
4. Обнаружена ДНК *B. mallei*

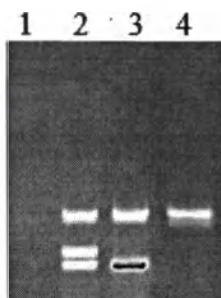


Рис. 3

Электрофореграмма результатов ПЦР при исследовании проб

1. ОКО
2. ПКО
3. Обнаружена ДНК *B. thailandensis*



1. В «положительном контроле» должны присутствовать три фрагмента ДНК размером 727 п.н., 440 п.н. и 352 п.н.

2. На электрофореграммах проб содержащих «отрицательный контроль» ампликоны должны отсутствовать.

3. Наличие трех ампликонов размерами 727 п.н., 440 п.н. и 352 п.н. на дорожке исследуемой ДНК-пробы, соответствующих по электрофоретической подвижности фрагментам ДНК в «положительном контроле», свидетельствует о присутствии в пробе ДНК *B. pseudomallei* и учитывается как «положительный результат».

4. Наличие двух ампликонов размерами 727 п.н. и 352 п.н. или одного ампликона размером 727 п.н. на дорожке исследуемой ДНК-пробы, соответствующих по электрофоретической подвижности фрагментам ДНК в «положительном контроле», свидетельствует о присутствии в пробе ДНК *B. mallei* и учитывается как «положительный результат».

5. Наличие двух ампликонов размерами 440 п.н. и 352 п.н. на дорожке исследуемой ДНК-пробы, соответствующих по электрофоретической подвижности фрагментам ДНК в «положительном контроле», свидетельствует о присутствии в пробе ДНК *B. thailandensis* и учитывается как «положительный результат».

6. Отсутствие на электрофореграммах анализируемых проб ампликонов при одновременном наличии таковых на дорожках с «положительным контролем» свидетельствует о том, что ДНК возбудителей сапа, мелиоидоза и *B. thailandensis* в анализируемой пробе отсутствует. Результат анализа учитывается как «отрицательный».

Инструкция по применению «Амплиген Буркхолдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh» Страница 12 из 13

результат». Наличие ампликонов в анализируемых пробах, размер которых не соответствуют таковым положительного контроля, не учитываются.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации, в соответствии с таблицей 5.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 21.20.23-014-01898084-2016 условия хранения компонентов набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D - EPh» - ПЦР-смесь № 1, ПЦР-смесь № 2, *Taq*-ДНК-полимераза, ПКО, ОКО, деионизованная вода при температуре от минус 16 до минус 20 °С, минеральное масло - при температуре от 18 до 25 °С.

8.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D - EPh» 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 2 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С - неограниченно.

8.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D - EPh» - 6 месяцев.

Условия эксплуатации набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D - EPh» – 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 Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D - EPh» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

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

Инструкция по применению «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D - EPh» Страница 13 из 13

Прошито и пронумеровано

13(Т/зипнагу) листов(а)

Зав.отд.делопроизводства

Чернова Е.А.

Подпись

МП

