

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от \_\_\_\_\_ 20 г. № \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»  
Роспотребнадзора  
\_\_\_\_\_ Кутырев В.В.  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201 г.

**ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ШТАММОВ *BRUCELLA* SPP. МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В  
РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ  
(ГЕН *BRUCELLA* – ИДЕНТИФИКАЦИЯ – РГФ)**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

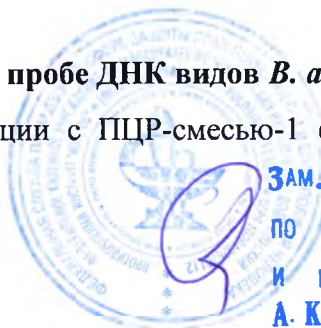
«Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов режима реального времени (Ген *Brucella* – идентификация – РГФ)», далее - набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», предназначен для идентификации штаммов бруцелл, выделенных из биологического материала и объектов внешней среды определением принадлежности к видам *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

**2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

**2.1. Принцип действия.**

Для идентификации и определения видовой принадлежности бруцелл исследования проводят с ПЦР-смесью-1 (содержит праймеры и зонды, специфичные генам BR0262 и BME0711) и ПЦР-смесью-2 (содержит праймеры и зонд, специфичные гену BRA0541). Реакцию амплификации осуществляют одновременно с каждой ПЦР-смесью.

Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. abortis* и *B. ovis* осуществляют на основании отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагмента гена BR0262 (кан-

  
ЗАМ. ДИРЕКТОРА  
ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ РАБОТЕ  
А. К. НИКИФОРОВ

ROX), наличия амплификации гена BME0711 (канал JOE), наличия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

**Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. melitensis*** осуществляют на основании отсутствия амплификации фрагмента гена BR0262 (канал ROX), наличия амплификации гена BME0711 (канал JOE), отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

**Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. suis* и *B. canis*** осуществляют на основании наличия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагментов гена BR0262 (канал ROX) и гена BME0711 (канал JOE), наличия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

**Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. neotomae*** осуществляют на основании наличия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагмента гена BR0262 (канал ROX), отсутствия амплификации гена BME0711 (канал JOE), наличия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

2.2. Состав набора:

| Реактив                 | Описание                                                                                                   | Объем (мл) | Количество |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| ПЦР-смесь-1             | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры, зонды, дНТФ и натрия азид                             | 0,15       | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-2             | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры, зонды, дНТФ и натрия азид                             | 0,15       | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-3             | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-HCl; аммония сульфат; магния хлорид; Tween-20; натрия азид | 0,6        | 1 пробирки |
| Taq ДНК-полимераза      | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая фермент с активностью 5 ед/мкл                                  | 0,012      | 1 пробирка |
| TE-буфер                | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-HCl; Na <sub>2</sub> -ЭДТА                                 | 1,0        | 1 пробирка |
| H <sub>2</sub> O        | прозрачная бесцветная жидкость, свободная от нуклеаз                                                       | 5,0        | 2 пробирки |
| ПКО ДНК <i>Brucella</i> | прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой водный раствор ДНК <i>B. suis</i>                     | 0,3        | 2 пробирки |

Набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» рассчитан на рассчитан на 30 определений, включая положительные и отрицательные контроли.

Зам. Директора  
по экспериментальной  
и производственной работе  
А. К. Никифоров

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Набор «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» не должен давать положительных результатов с ДНК микроорганизмов других родов в концентрации  $1 \times 10^4$  м.к./мл.

**3.2. Аналитическая чувствительность.** Набор «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» должен идентифицировать штаммы бруцелл и определять их принадлежность к видам *B. abortus*/*B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis*/*B. canis*; *B. neotomae* при концентрации суспензий исследуемых культур не менее  $1 \times 10^4$  м.к./мл.

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**4.1.** Использование набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» с истекшим сроком годности недопустимо.

**4.2.** Работу проводят в соответствии с требованиями СП 13.1285 – 03 «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».

**4.3.** Уничтожение наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ\*:

| Наименование                                                                                           | Основные характеристики или обозначения документации, производитель                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                      | 2                                                                                                                                                                        |
| Амплификатор «RotorGene 3000», «RotorGene 6000», "RotorGene Q"                                         | «Qiagen», Нидерланды                                                                                                                                                     |
| Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики | БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" «Ламинарные системы», Россия                                                                                                                         |
| Микроцентрифуга-встряхиватель                                                                          | «ТЭТА-2», «Биоком», Россия                                                                                                                                               |
| Штатив IsoFreeze на 0°C или термостат твердотельный с функцией охлаждения                              | Штатив для пробирок 0,5 мл и 1,5-2 мл поддерживающий температуру 0°C в течении 5 часов, 20 лунок, «SSI», США или термоста с температурой от 4 до 120 °C, «Биоком» Россия |
| Набор электронных или механических дозаторов переменного объема                                        | 0,5-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, Biohi Финляндия                                                                                                                    |
| Штатив-подставка для дозаторов                                                                         | Универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон» Россия                                                                                                                           |
| Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл            | В штативе, «Ахуген», США                                                                                                                                                 |
| Наконечники универсальные для                                                                          | В штативе, «Ахуген», США                                                                                                                                                 |

|                                                                                               |                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл                                |                                                                                                     |
| Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл | В штативе, «Ахуген», США                                                                            |
| Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл                                            | 10×20 мест, «Хеликон», Россия                                                                       |
| Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл                                | «Ахуген», США                                                                                       |
| Микроцентрифужные пробирки объемом 0,6 мл                                                     | «Ахуген», США                                                                                       |
| Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл                                                     | «Ахуген», США                                                                                       |
| Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой и не выше минус 18 °С                          | «Атлант», Россия                                                                                    |
| Емкость (для сброса отработанных расходных материалов)                                        | «Гем», Россия                                                                                       |
| Одноразовый халат                                                                             | Халат медицинский стандартного покро- плотность ткани 42 г/м <sup>2</sup> , «Здравмедтехника Россия |
| Одноразовые перчатки                                                                          | Перчатки смотровые, текстурированные неопудренные «Sempercare», Германия                            |

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

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат: суспензии культур, выделенных из биологического материала и объектов внешней среды, предварительно идентифицированных как *Brucella* spp. на основании изучения морфометрических, биохимических, серологических свойств или ПЦР-исследования с помощью наборов реагентов «ГенБру» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») и «АмплиСенс *Brucella* spp. – FL» (ООО ИнтерЛабСервис).

Из культур бруцелл 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  $1,7 \times 10^9$  м.к./мл для *Brucella* spp.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-анализ состоит из следующих этапов: обеззараживание материала, выделения ДНК; амплификация, регистрация и учет результатов.

### 7.1 Обеззараживание материала:

Материал обеззараживают в соответствии с МУ 1.3.2569 -09 «Организация работ в лабораториях, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Зам. Директора

по экспериментальной

и производственной работе

А. К. Никифоров

Бактериальные суспензии бруцелл в объеме 1 мл переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01%) и прогревают при  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Затем в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл переносят по 100 мкл обработанной мертиолятом натриевой бактериальной суспензии бруцелл, добавляют лизирующий буфер на основе 6-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 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют методом нуклеосорбции на силикагеле и последующей преципитации в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием коммерческих наборов: «Комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В», «Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп», «Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора и аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанным наборам. Элюцию ДНК осуществляют в 100 мкл ТЕ-буфера или РНК-элюента.

Для проведения последующих исследований полученные препараты ДНК последовательно разводят в 100 и 10000 раз, получая разведения ДНК  $1 \times 10^6$  и  $1 \times 10^7$  ГЭ/мл. Для этого из набора извлекают пробирки «Н<sub>2</sub>О» объемом 5 мл, отбирают для каждого исследуемого штамма бруцелл по две микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и переносят в них по 495 мкл воды. Затем отдельными наконечниками аэрозольным барьером в первые пробирки вносят по 5 мкл препаратов ДНК, пробирки перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 30 с для осаждения капель со стенок пробирок. Затем из этих пробирок переносят по 5 мкл во вторые пробирки с 495 мкл воды, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 30 с для осаждения капель со стенок пробирок.

Для последующего анализа используют только разведения ДНК  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл!!!

## 7.3 Проведение ПЦР – амплификация ДНК

Для проведения ПЦР из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-2, ПЦР-смесь-3, ТЕ-буфер, из морозильной камеры извлекают фермент Taq ДНК-полимераза, ПКО ДНК *Brucella*. Пробирки с ПКО ДНК *Brucella* полностью

размораживают при комнатной температуре или при температуре  $(6\pm 1)^\circ\text{C}$ . Все микропробирки тщательно перемешают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 30 с для осаждения капель со стенок пробирок.

Для проведения реакции отбирают необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл с плоской крышкой:

- для РС-1 – количество исследуемых проб и 2 пробирки для ПКО ДНК *Brucella* и К-;
- для РС-2 - количество исследуемых проб и 2 пробирки для ПКО ДНК *Brucella* и К-.

В отдельных 2 микроцентрифужных пробирках объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционные смеси:

- РС-1 из расчета: ПЦР-смесь-1 – 5 мкл, ПЦР-смесь-3 – 10 мкл, Таq ДНК-полимераза – 0,2 мкл.
- РС-2 из расчета: ПЦР-смесь-2 – 5 мкл, ПЦР-смесь-3 – 10 мкл, Таq ДНК-полимераза – 0,2 мкл.

Полученные смеси тщательно перемешивают и переносят по 15 мкл в подготовленные и соответствующим образом промаркированные пробирки объемом 0,2 мл.

В первую или последнюю пробирку с каждой РС вносят по 10 мкл ТЕ-буфера (отрицательный контроль амплификации "К-").

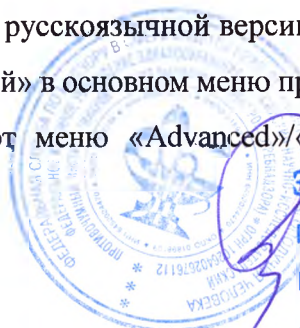
Затем в пробирки с РС-1 и РС-2 вносят по **10 мкл ДНК** из исследуемых штаммов бруцелл **в разведении  $1\times 10^4$  (!!!)**. В заключение в одну пробирку с РС-1 и РС-2 вносят по 10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа RotorGene в следующем порядке: пробирки с РС-1, РС-2.

### Программирование амплификатора:

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 используют программу Rotor-Gene версии 6, с прибором «Rotor-Gene» 6000- программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7 (build 67) или выше. При описании программы термины для каждой версии программы представлены следующим образом: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / 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».

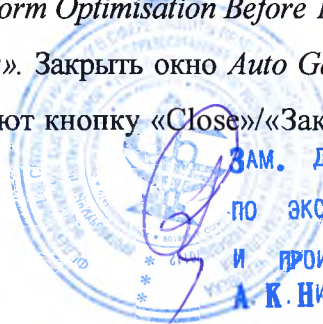


Зам. Директора  
по экспериментальной  
и производственной работе  
А. К. Никифоров

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». (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, ставят ее с помощью мышки).
6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
8. Задают следующие параметры эксперимента:
 

|                             |                                              |
|-----------------------------|----------------------------------------------|
| 8.1.Hold/Удерж. температуры | 95 °C - 5 мин                                |
| 8.2.Cycling/Циклирование    | 95 °C - 30 с                                 |
|                             | 60 °C - 30 с                                 |
|                             | 72 °C - 30 с                                 |
|                             | Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз. |
| 8.3. Cycling2/Циклирование2 | 95 °C - 20 с                                 |
|                             | 57 °C - 20 с                                 |
|                             | 72 °C - 20 с- Детекция                       |
|                             | Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз. |

Флюоресценцию измеряют при 72 °C (во втором блоке циклирования) по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange.
- 8.4. Нажимают кнопку «OK»/«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 всех красителей (JOE, ROX) 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 PC-1. Помечают галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрыть окно *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала*, нажимают кнопку «Close»/«Закрыть». Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



ЗАМ. ДИРЕКТОРА

ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ

И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ РАБОТЕ

А. К. НИКИФОРОВ

10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт».
11. Дают название эксперимента 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 пробирки обозначают в меню Samples/Образцы как Unknown/Неизвестный.

## 8. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Регистрация и учет результатов ППР с РС-1

#### **Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (ген BME0711):**

Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».

1. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
2. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
3. 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).
4. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %.
5. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,1.
6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения (Ct).

#### **Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange (ген BR0262):**

Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. ROX»/«Cycling A. Orange», нажимают кнопку «Show»/«Показать».

7. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
8. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».

9. 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).
10. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %.
11. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.
12. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения (Ct).

### **Регистрация и учет результатов ППР с РС-2**

#### **Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (ген BRA0541):**

Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».

13. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
14. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
15. 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).
16. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %.
17. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.
18. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения (Ct).

### **Интерпретация результатов амплификации с РС-1 и РС-2**

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения амплификатора цикла (Ct) в соответствующей графе в таблице результатов).

К учету результатов исследуемых проб с PC-1 и PC-2 приступают только в случае прохождения положительных (К+), отрицательных (К-) контролей амплификации (таблица).

| Наименование<br>контроля | Значения порогового цикла (Ct) по каналам |               |                |
|--------------------------|-------------------------------------------|---------------|----------------|
|                          | PC-1                                      |               | PC-2           |
|                          | JOE<br>BME0711                            | ROX<br>BR0262 | JOE<br>BRA0541 |
| К +                      | ≤33                                       | ≤33           | ≤33            |
| К-                       | -                                         | -             | -              |

Учет и интерпретацию результатов с PC-1 и PC-2 проводят в соответствии с таблицей.

| Пробы                    | Значения порогового цикла (Ct) по каналам |                             |                             | Результат<br>анализа                                                                                            |
|--------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          | PC-1                                      |                             | PC-2                        |                                                                                                                 |
|                          | JOE<br>(BME0711)                          | ROX<br>(BR0262)             | JOE<br>(BRA0541)            |                                                                                                                 |
| Исследу<br>емые<br>пробы | ≤33                                       | Отсутствие<br>флуоресценции | ≤33                         | Положительный/<br>виды <i>B. abortus/B. ovis</i> .                                                              |
|                          | ≤33                                       | Отсутствие<br>флуоресценции | Отсутствие<br>флуоресценции | Положительный/<br>вид <i>B. melitensis</i>                                                                      |
|                          | ≤33                                       | ≤33                         | ≤33                         | Положительный/виды<br><i>B. suis/B. canis</i> .                                                                 |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | ≤33                         | ≤33                         | Положительный/вид<br><i>B. neotomae</i> .                                                                       |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | ≤33                         | Отсутствие<br>флуоресценции | Штамм не<br>принадлежит к роду<br><i>Brucella</i> .<br>Необходимо уточнить<br>его систематическое<br>положение. |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | Отсутствие<br>флуоресценции | ≤33                         |                                                                                                                 |
|                          | ≤33                                       | ≤33                         | Отсутствие<br>флуоресценции |                                                                                                                 |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | Отсутствие<br>флуоресценции | Отсутствие<br>флуоресценции |                                                                                                                 |

Зам. Директора  
по экспериментальной  
и производственной работе  
А. К. Никифоров

## 9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Условия хранения – ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-2, ПЦР-смесь-3, ТЕ-буфер, H<sub>2</sub>O при температуре от 2 до 8 °С, Таq ДНК-полимераза, ПКО ДНК *Brucella* - при температуре от минус 16 до минус 20 °С. Срок годности-6 месяцев.

Рекламации на качество «Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методами полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Brucella* – идентификация – РГФ)» в течение срока годности направлять в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46 Тел. ((845-2) 51-59-65).

Зам. директора по экспериментальной и  
производственной работе ФКУЗ  
РосНИПЧИ «Микроб»



А.К.Никифоров

В данном документе  
пронумеровано,  
прошнуровано и скреплено  
печатью листов.

*19/01/2018*  
КАНЦЕЛЯРИЯ  
Начальник отдела  
делопроизводства  
*Р.Н. Косолапова*  
Косолапова Р.Н.

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от \_\_\_\_\_ 20 г. № \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»  
Роспотребнадзора  
Кутырев В.В.  
« 12 » \_\_\_\_\_ 2014 г.

**ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ШТАММОВ *BRUCELLA* SPP. МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В  
РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ  
(ГЕН *BRUCELLA* – ИДЕНТИФИКАЦИЯ – РГФ)**

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Brucella* – идентификация – РГФ)», далее - набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», предназначен для идентификации штаммов бруцелл, выделенных из биологического материала и объектов внешней среды с определением принадлежности к видам *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

## 2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика. 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.

## 3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

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. ПРИНЦИП МЕТОДА

Для идентификации и определения видовой принадлежности бруцелл исследования проводят с ПЦР-смесью-1 (содержит праймеры и зонды, специфичные к генам BR0262 и BME0711) и ПЦР-смесью-2 (содержит праймеры и зонд, специфичные к

гену BRA0541). Реакцию амплификации осуществляют одновременно с каждой смесью.

**Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. abortis* и *B. ovis*** осуществляют на основании отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагмента гена BR0262 (канал ROX), наличия амплификации гена BME0711 (канал JOE), наличия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

**Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. melitensis*** осуществляют на основании отсутствия амплификации фрагмента гена BR0262 (канал ROX), наличия амплификации гена BME0711 (канал JOE), отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

**Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. suis* и *B. canis*** осуществляют на основании наличия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагментов гена BR0262 (канал ROX) и гена BME0711 (канал JOE), наличия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

**Подтверждение наличия в пробе ДНК видов *B. neotomae*** осуществляют на основании наличия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагмента гена BR0262 (канал ROX), отсутствия амплификации гена BME0711 (канал JOE), наличия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена BRA0541 (канал JOE).

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 7 реактивов

| Реактив                 | Описание                                                                                                   | Объем (мл) | Количество |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| ПЦР-смесь-1             | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры, зонды, дНТФ и натрия азид                             | 0,15       | 1 проба    |
| ПЦР-смесь-2             | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры, зонды, дНТФ и натрия азид                             | 0,15       | 1 проба    |
| ПЦР-смесь-3             | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl; аммония сульфат; магния хлорид; Tween-20; натрия азид | 0,6        | 1 проба    |
| Taq ДНК-полимераза      | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая фермент с активностью 5 ед/мкл                                  | 0,012      | 1 проба    |
| ТЕ-буфер                | прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl; Na <sub>2</sub> -ЭДТА                                 | 1,0        | 1 проба    |
| H <sub>2</sub> O        | прозрачная бесцветная жидкость, свободная от нуклеаз                                                       | 5,0        | 2 пробы    |
| ПКО ДНК <i>Brucella</i> | прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой водный раствор ДНК <i>B. suis</i>                     | 0,3        | 2 пробы    |

Набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» рассчитан на 30 определений, включая положительные и отрицательные контроли.

**6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ\*:**

| Наименование                                                                                           | Основные характеристики или обозначения в документации, производитель                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                      | 2                                                                                                                                                                         |
| Амплификатор «RotorGene 3000», «RotorGene 6000», "RotorGene Q"                                         | «Qiagen», Нидерланды                                                                                                                                                      |
| Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики | БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" «Ламинарные системы», Россия                                                                                                                          |
| Микроцентрифуга-встряхиватель                                                                          | «ТЭТА-2», «Биоком», Россия                                                                                                                                                |
| Штатив IsoFreeze на 0°C или термостат твердотельный с функцией охлаждения                              | Штатив для пробирок 0,5 мл и 1,5-мл, поддерживающий температуру 0°C в течение 5 часов, 20 лунок, «SSI», США или термостат с температурой от 4 до 120 °C, «Биоком», Россия |
| Набор электронных или механических дозаторов переменного объема                                        | 0,5-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, «Хеликс», Финляндия                                                                                                                 |
| Штатив-подставка для дозаторов                                                                         | Универсальная на 5 дозаторов, «Хеликс», Россия                                                                                                                            |
| Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл            | В штативе, «Axygen», США                                                                                                                                                  |
| Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл           | В штативе, «Axygen», США                                                                                                                                                  |
| Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл          | В штативе, «Axygen», США                                                                                                                                                  |
| Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл                                                     | 10×20 мест, «Хеликс», Россия                                                                                                                                              |
| Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл                                         | «Axygen», США                                                                                                                                                             |
| Микроцентрифужные пробирки объемом 0,6 мл                                                              | «Axygen», США                                                                                                                                                             |
| Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл                                                              | «Axygen», США                                                                                                                                                             |
| Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой и не выше минус 18 °C                                   | «Атлант», Россия                                                                                                                                                          |
| Ёмкость (для сброса отработанных расходных материалов)                                                 | «Гем», Россия                                                                                                                                                             |
| Одноразовый халат                                                                                      | Халат медицинский стандартного размера, плотность ткани 42 г/м <sup>2</sup> , «Здравмедтех», Россия                                                                       |
| Одноразовые перчатки                                                                                   | Перчатки смотровые, текстурированные, неопудренные «Sempercare», Германия                                                                                                 |

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

## 7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» транспортироваться всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями ГОСТ 15150 и правилами, установленными для каждого вида транспорта. Условия транспортирования - при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более при температуре от минус 16 до минус 20 °С – неограниченно.

Условия хранения – ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-2, ПЦР-смесь-3, ТЕ-буфер, I температура от 2 до 8 °С, Taq ДНК-полимераза, ПКО ДНК *Brucella* - при температуре от минус 16 до минус 20 °С. Срок годности - 6 месяцев.

Условия эксплуатации набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – I» при температуре от 18 до 25 °С.

## 8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Использование набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» с истекшим сроком годности недопустимо.

Работу проводят в соответствии с требованиями СП 13.1285 – 03 «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».

## 9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат: суспензии культур, выделенные из биологического материала и объектов внешней среды, предварительно идентифицированных как *Brucella spp.* на основании изучения морфометрических, биохимических, серологических свойств или ПЦР-исследования с помощью набора реагентов «ГенБру» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») и «АмплиСенс *Brucella spp.*» (ООО ИнтерЛабСервис).

Из культур бруцелл готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 85-П (10МЕ)), что соответствует  $1,7 \times 10^9$  м.к./мл для *Brucella spp.*

## 10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-анализ состоит из следующих этапов: обеззараживание материала, выделение ДНК; амплификация, регистрация и учет результатов.

### 10.1 Обеззараживание материала:

Материал обеззараживают в соответствии с МУ 1.3.2569 -09 «Организации лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при материальном, содержащем микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Бактериальные суспензии бруцелл в объеме 1 мл переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 и прогревают при  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Затем в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл переносят по 100 мкл обработанной мертиолятом бактериальной суспензии бруцелл, добавляют лизирующий буфер на основе гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения и инкубируют 15 минут при температуре  $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$ . После выполнения данного материала считается обеззараженным.

### 10.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют методом нуклеосорбции на силикагеле с последующей преципитацией в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием коммерческих наборов: «Комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала сорб-В», «Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала сорб-В», «Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала сорб-В», «Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала сорб-В» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора и аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанным наборам. Элюцию ДНК осуществляют в 100 мкл ТЕ-буфера или РНК-элюента.

Для проведения последующих исследований полученные препараты ДНК последовательно разводят в 100 и 10000 раз, получая разведения ДНК  $1 \times 10^6$  и  $1 \times 10^4$  (что соответствует количеству ДНК, выделенному из бактериальной суспензии бруцелл с концентрациями  $1 \times 10^6$  и  $1 \times 10^4$  м.к./мл, соответственно). Для этого из набора из микроцентрифужных пробирок «Н<sub>2</sub>О» объемом 5 мл, отбирают для каждого исследуемого штамма бруцелл две микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и переносят в них по 495 мкл. Затем отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в первые пробирки вносят по 5 мкл препаратов ДНК, пробирки перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 30 с для осаждения капель со стенок пробирок. Затем из этих пробирок переносят по 5 мкл во вторые пробирки с 495 мкл воды, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 30 с для осаждения капель со стенок пробирок.

**Для последующего анализа используют препарат ДНК, разведенный в 10<sup>6</sup> раз (что соответствует количеству ДНК, выделенному из бактериальной суспензии бруцелл с концентрацией  $1 \times 10^4$  м.к./мл) !!!**

### 10.3 Проведение ПЦР – амплификация ДНК

Для проведения ПЦР из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-3, ТЕ-буфер, из морозильной камеры извлекают фермент Т полимеразы, ПКО ДНК *Brucella*. Пробирки с ПКО ДНК *Brucella* размораживают при комнатной температуре или при температуре  $(6 \pm 1)$  микропробирки тщательно перемешивают на микроцентрифуге-встряхивают, центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 30 с для осаждения капель пробирок.

Для проведения реакции отбирают необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл с плоской крышкой:

- для РС-1 – количество исследуемых проб и 2 пробирки для ПКО ДНК *Brucella*
- для РС-2 - количество исследуемых проб и 2 пробирки для ПКО ДНК *Brucella*

В отдельных 2 микроцентрифужных пробирках объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционные смеси:

- РС-1 из расчета: ПЦР-смесь-1 – 5 мкл, ПЦР-смесь-3 – 10 мкл, Таq ДНК-полимераза – 0,2 мкл.
- РС-2 из расчета: ПЦР-смесь-2 – 5 мкл, ПЦР-смесь-3 – 10 мкл, Таq ДНК-полимераза – 0,2 мкл.

Полученные смеси тщательно перемешивают и переносят по 15 мкл в подготовленные и соответствующим образом промаркированные пробирки объемом 0,6 мл.

В первую или последнюю пробирку с каждой РС вносят по 10 мкл Т (отрицательный контроль амплификации "К-").

Затем в пробирки с РС-1 и РС-2 вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых бруцелл в разведении  $1 \times 10^4$  (!!!). В заключение в одну пробирку с РС-1 и РС-2 вносят по 10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа Rotor-Gene в следующем порядке: пробирки с РС-1, РС-2.

#### Программирование амплификатора:

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 используют программу Rotor-Gene 3000, с прибором «Rotor-Gene» 6000- программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7 (build 1.7.0.0) и выше. При описании программы термины для каждой версии программы приводятся в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / 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». На

кнопку «New»/«Новый».

3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят от-  
рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо :  
4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
5. Выбирают объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции -  
прибора «Rotor-Gene 6000» должно быть активно (отмечено галочкой) ок  
layer volume»/«15 µL объем масла/воска». (Если галочка не стоит в окне по  
ставят ее с помощью мышки).
6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
8. Задают следующие параметры эксперимента:
  - 8.1. Hold/Удерж. температуры 95 °C - 5 мин
  - 8.2. Cycling/Циклирование 95 °C - 30 с  
60 °C - 30 с  
72 °C - 30 с  
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
  - 8.3. Cycling2/Циклирование2 95 °C - 20 с  
57 °C - 20 с  
72 °C - 20 с- Детекция  
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.  
Флюоресценцию измеряют при 72 °C (во втором блоке циклирования)  
JOE/Yellow, ROX/Orange.
  - 8.4. Нажимают кнопку «OK»/«Да».
9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calib  
Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.». В открывшемся окне нажимают кноп  
Acquiring»/«Optimise Acquiring»/ «Опт.детек-мых». Для всех красителей  
указывают в графе *Min Reading*/Миним. Сигнал значение 5, а в  
*Reading*/Максим. Сигнал значение 10. В графе *Tube position*/Позиция Проб  
номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain  
сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиц  
должна ставиться пробирка с PC-1. Помечают галочкой бокс в стро  
*Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition*»/«Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition»/«  
оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывают окно *Auto Gain Calibration*  
оптимизация уровня сигнала, нажимают кнопку «Close»/«Закреть». Нажим  
«Next»/«Далее».
10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт».

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

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы проположение пробирок в карусели. Для этого используют кнопку «Edit samples/образцов» (в нижней правой части основного окна). Все пробирки обозначают Samples/Образцы как Unknown/Неизвестный.

## **11. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

### **Регистрация и учет результатов ПЦР с РС-1**

#### **Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (ген ВМ)**

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню Cycling A. JOE»/«Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если не 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» выбирают значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выбирают Threshold/Порог = 0,1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения (Ct).

#### **Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange (ген ВМ)**

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. ROX»/«Orange», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если не 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»

значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %.

6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) Threshold/Порог = 0,05.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Р» появятся значения (Ct).

### **Регистрация и учет результатов ПЦР с PC-2**

#### **Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (ген BR**

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. JOE»/«Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если неактивна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна Log scale/Лог.шкала).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) Threshold/Порог = 0,05.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Р» появятся значения (Ct).

#### **Интерпретация результатов амплификации с PC-1 и PC-2**

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (Ct) соответствующей графе в таблице результатов).

К учету результатов исследуемых проб с PC-1 и PC-2 приступают только после прохождения положительных (К+), отрицательных (К-) контролей амплификации (таблица).

| Наименование контроля | Значения порогового цикла (Ct) по каналам |            |             |
|-----------------------|-------------------------------------------|------------|-------------|
|                       | PC-1                                      |            | PC-2        |
|                       | JOE BME0711                               | ROX BR0262 | JOE BRA0541 |
| К +                   | ≤33                                       | ≤33        | ≤33         |
| К-                    | -                                         | -          | -           |

Учет и интерпретацию результатов с PC-1 и PC-2 проводят в соот-  
таблицей.

| Пробы                    | Значения порогового цикла (Ct) по каналам |                             |                             | Резуль<br>анали                                                                                               |
|--------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          | PC-1                                      |                             | PC-2                        |                                                                                                               |
|                          | JOE<br>(BME0711)                          | ROX<br>(BR0262)             | JOE<br>(BRA0541)            |                                                                                                               |
| Исследу<br>емые<br>пробы | ≤33                                       | Отсутствие<br>флуоресценции | ≤33                         | Положительны<br>виды <i>B. abort</i>                                                                          |
|                          | ≤33                                       | Отсутствие<br>флуоресценции | Отсутствие<br>флуоресценции | Положительны<br>вид <i>B. meliten</i>                                                                         |
|                          | ≤33                                       | ≤33                         | ≤33                         | Положительны<br><i>B. suis/B. cani</i> .                                                                      |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | ≤33                         | ≤33                         | Положительны<br><i>B. neotomae</i> .                                                                          |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | ≤33                         | Отсутствие<br>флуоресценции | Штамм <b>не<br/>принадлежит<br/><i>Brucella</i>.</b><br><i>Необходимо ун<br/>его системати<br/>положение.</i> |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | Отсутствие<br>флуоресценции | ≤33                         |                                                                                                               |
|                          | ≤33                                       | ≤33                         | Отсутствие<br>флуоресценции |                                                                                                               |
|                          | Отсутствие<br>флуоресценции               | Отсутствие<br>флуоресценции | Отсутствие<br>флуоресценции |                                                                                                               |

## 12. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**12.1. Аналитическая чувствительность.** Набор «Ген *Brucella* – идентификаци  
должен идентифицировать штаммы бруцелл и определять их принадлежность к  
*abortus/B. ovis; B. melitensis; B. suis/B.canis; B.neotomae* при концентрации с  
исследуемых культур не менее 1×10<sup>4</sup> м.к./мл.

**12.2. Аналитическая специфичность.** Набор «Ген *Brucella* – идентификация –  
должен давать положительных результатов с ДНК микроорганизмов других р  
суспензиях концентрации 1×10<sup>4</sup> м.к./мл.

### 12.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - не менее 98,5 % с доверительной вероятн  
% при исследовании 228 положительных образцов, содержащих *B. abortus/B.*  
*melitensis; B. suis/B.canis; B.neotomae* при концентрации суспензий исследуемых  
не менее 1×10<sup>4</sup> м.к./мл.

#### 12.4. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - не менее 99 % с доверительной вероятностью при исследовании 228 положительных образцов, содержащих ДНК бруцеллы, отрицательных образцов, содержащих ДНК гетерологичных микроорганизмов.

#### 13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение наборов реагентов с истекшим сроком годности проводится в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

#### 14. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Ген *Brucella* идентификация – РГФ» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

Рекламации на качество «Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* методами полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным анализом результатов в режиме реального времени (Ген *Brucella* – идентификация – РГФ)» в течение срока годности направлять в организацию – производитель ФКУЗ Роспотребнадзора «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46 Тел. ((8452) 69-65).

Зам. директора по экспериментальной и  
производственной работе ФКУЗ  
РосНИПЧИ «Микроб»

Директор ФКУЗ Ставропольский  
противочумный институт Роспотребнадзора  
д.м.н., профессор



А.К. Никифоров



В.Н. Куличев

Прошито и пронумеровано  
и скреплено печатью

11 листа (ов).

Начальник отдела делопроизводства

Косолапова Р.Н.  
М.П.

20 14 года

