



Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

Роспотребнадзора

Кутырев В.В.

06 2015 г.

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК *YERSINIA PESTIS* / *FRANCISELLA TULARENSIS* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
(ГЕН *YERSINIA PESTIS* / *FRANCISELLA TULARENSIS* ИНДИКАЦИЯ – РГФ)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления РНК *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ)», далее - набор реагентов «Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ», предназначен для выявления РНК жизнеспособных клеток возбудителей чумы и туляремии в пробах клинического, биологического материала и объектов окружающей среды методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. 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

Выявление РНК возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени основано на амплификации фрагмента гена *yihN Yersinia pestis* с образованием флуоресценции по каналу FAM на кДНК патогена, полученной путем обратной транскрипции с РНК возбудителя чумы.

Выявление РНК возбудителя туляремии методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени основано на амплификации фрагмента гена *mviN Francisella tularensis* с образованием флуоресценции по каналу JOE на кДНК патогена, полученной путем обратной транскрипции с РНК возбудителя туляремии.

Проведение анализа включает четыре основных этапа: выделение РНК/ДНК из проб клинического материала, обработка препарата нуклеиновых кислот ДНК-азой для получения РНК, проведение обратной транскрипции для получения кДНК, амплификация

участков кДНК возбудителя чумы и туляремии на приборе типа **Rotor Gene** и регистрация с помощью программного обеспечения кривых флуоресценции.

Амплификация фрагмента кДНК происходит в буферном растворе за счет праймеров, комплементарных последовательности *yihN* гена чумного микроба и *mviN* гена тулярийного микроба, олигонуклеотидных зондов типа TaqMan с флуоресцентными метками FAM-RTQ1 и R6G-RTQ1, соответственно, смеси нуклеотидов (дНТФ), фермента Taq ДНК-полимеразы. Все компоненты, за исключением фермента, содержатся в ПЦР-смеси-1 и ПЦР-смеси-РГФ. Образование флуоресцентного сигнала происходит за счет освобождения флуоресцентных меток при расщеплении зонда ферментом Taq ДНК-полимеразы (5'-экзонуклеазная активность). С каждым циклом ПЦР число свободных флуоресцентных меток экспоненциально возрастает, что приводит к повышению уровня флуоресценции в пробирке.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 10 реагентов:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество (шт.)
1	2	3	4
ПЦР-смесь 1	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры, зонды, дНТФ и натрия азид	0,25	1 пробирка
ПЦР-смесь 2	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl; аммония сульфат; магния хлорид; Tween-20	0,5	1 пробирка
Тaq-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость	0,01	1 пробирка
ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl; Na ₂ -ЭДТА	1,0	3 пробирки
Вода, свободная от нуклеаз	прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
ДНКаза	прозрачная бесцветная жидкость	0,05	1 пробирка
Реакционный буфер для ДНКазы	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl, магния сульфат, кальция хлорид.	0,05	1 пробирка
Стоп-буфер для ДНКазы	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая ЭГТА	0,05	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Y. pestis</i>	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой водный раствор ДНК <i>Y. pestis</i>	0,3	1 пробирка
ПКО ДНК <i>F. tularensis</i>	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой водный раствор ДНК <i>F. tularensis</i>	0,3	1 пробирка

Набор реагентов «Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ» рассчитан на 50 определений с учетом контрольных образцов.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ*:

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа RotorGene	Амплификатор «RotorGene 3000», «RotorGene 6000», «RotorGene Q», «Qiagen», Германия
Ламинарный бокс биологической безопасности класс IIВ	Ламинарный бокс биологической безопасности класс II БАВп-«Ламинар-С-1,2», «Ламинарные системы», Россия
ПЦР-бокс	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» «Ламинарные системы», Россия
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-встряхиватель «ТЭТА-2», «Биоком», Россия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, Термо 24-15, «Биоком», Россия.
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга на 13400 об/мин "Mini Spin" "Eppendorf", Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский "ОМ-1" ОАО "Утес", Россия
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
Набор электронных или механических дозаторов переменного объема	Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (0,5-10, 10-100 мкл, 100-1000 мкл), Eppendorf, Германия
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл, 10×20 мест, «Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 5×10 мест с увеличенным расстоянием между лунками, «Хеликон», Россия
Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 18°С	«Атлант», Россия
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 10 мкл	ФСЗ 2009/05025 «Ахуген», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 100 мкл	ФСЗ 2009/05025 «Ахуген», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 200 мкл	ФСЗ 2009/05025 «Ахуген», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 1000 мкл	ФСЗ 2009/05025 «Ахуген», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Ахуген», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Ахуген», США

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

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

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Транспортирование набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ» 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 – в пределах установленного срока годности.

Условия хранения компонентов набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ» – ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-2, ТЕ-буфер при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С, ДНКаза, реакционный буфер для ДНКазы, стоп-буфер для ДНКазы, Таq-полимераза, вода, свободная от нуклеаз, ПКО ДНК *Y. pestis*, ПКО ДНК *F. tularensis* - при температуре от минус 16 до минус 20 °С. Срок годности набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ» - 6 месяцев.

Условия эксплуатации набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ» – при температуре от 18 до 25 °С.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Использование набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ» с истекшим сроком годности недопустимо.

Работу 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».

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат: суспензии культур возбудителей чумы и туляремии или подозрительных изолятов; кровь; мокрота; мазки из зева; моча; пунктаты бубона, отделяемое язв; фекалии; ликвор; органы лабораторных и диких животных; эктопаразиты (блохи, клещи); вода открытых водоемов, почва, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников.

Отбор проб клинического, биологического материала и объектов окружающей среды и их транспортировка в лабораторию для исследования методом ПЦР проводят в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV 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».

Транспортировка проб биологического материала и объектов окружающей среды в лабораторию для исследований проводится при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение суток. После проведения предварительной обработки проб допускается их транспортировка при температуре от минус 16 до минус 20 °С в течение 7 суток, либо в

сосуде Дьюара с жидким азотом - длительно.

С целью предотвращения разрушения нуклеиновых кислот возможно использование транспортной среды следующего состава: сахара - 0,218 моль; K_2HPO_4 - 0,0038 моль, K_2HPO_4 - 0,0072 моль; 1 % БСА. При необходимости длительного хранения и (или) транспортировки, при отсутствии низкотемпературных холодильников, используют специальную транспортную среду ESP: 1 % саркозил; 0,05 моль ЭДТА; 1 мг/мл проназа Е. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при температуре от плюс 20 до плюс 30 °С в темном месте до 10 дней.

9.1 Чистые культуры микроорганизмов

Из культур возбудителей чумы и туляремии или подозрительных изолятов готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-59-86П), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для *Y. pestis* и 5×10^9 для *F. tularensis*. Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^3 м.к./мл.

9.2 Кровь

Кровь у людей берут из локтевой вены в количестве 4,5 мл стерильным шприцем, в который предварительно вносят 0,5 мл стерильного 4 % раствора натрия цитрата и переносят в стерильные стеклянные пробирки или специальные пластиковые пробирки с пробкой. Аккуратно перемешивают покачиванием. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК/РНК.

9.3 Мокрота

Мокроту отбирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и закручивающимися крышками объемом не менее 50 мл. В емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5:1 (5 частей «Муколизина» к 1 части мокроты). В процессе разжижения мокроты (20 - 30 мин.) емкость периодически встряхивают. Затем автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в пробирку с закручивающейся крышкой или в микроцентрифужную пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 5000-7000 g в течение 10 мин. Удаляют 0,8 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,2 мл оставшейся жидкости. Допускается выделение ДНК/РНК из 0,1 мл разжиженной мокроты без стадии центрифугирования.

9.4 Мазки из зева

Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой (например, № 2) и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде, которую используют для выделения ДНК/РНК.

9.5 Моча

Мочу (первую утреннюю порцию) отбирают в количестве не менее 20 - 30 мл в специальный сухой стерильный флакон. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют в течение 10 минут при 10000 об/мин, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

9.6 Пунктат из бубона, отделяемое кожных элементов

Пунктат из бубона, отделяемое язв (везикул, пустул, карбункулов) 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. Иглу вводят с таким расчетом, чтобы ее острие достигло центральной части бубона, после чего, оттянув до

отказа поршень, медленно вытягивают иглу. После извлечения иглы из бубона через нее набирают в шприц 0,5 мл стерильного питательного бульона (рН 7,2), содержимое выливают в стерильную пробирку и закрывают стерильной резиновой пробкой. Бульон можно набрать в шприц и до начала пункции. При вскрывшемся бубоне забирают материал отдельно из периферической плотной части и отделяемое свища. Обе порции исследуют раздельно. При кожных поражениях иглу шприца вводят у края везикулы (пустулы) и затем продвигают к середине. У карбункулов и язв пунктируют плотный край.

9.7 Фекалии

Фекалии отбирают в объеме 1 - 3 мл. Пробу отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в стерильный флакон. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлористого), отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 мл фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии.

Пробирки с суспензией центрифугируют при 7000 - 12000 об/мин в течение 5 мин. Отдельным наконечником с фильтром из каждой пробирки 0,1 мл со дна пробирки или с границы осадка или супернатанта, соответственно. Отобранную часть пробы переносят в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлористого). Проводят тщательное ресуспендирование осадка на вортексе с последующим центрифугированием при 7000 - 12000 об/мин в течении 15 мин. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 0,1 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлористого).

9.8 Ликвор

Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

9.9 Органы животных

Органы лабораторных и диких животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки органов массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин, осадок суспендируют в ТЕ-буфере или 0,9 % растворе натрия хлористого и используют для выделения ДНК/РНК.

9.10 Эктопаразиты (блохи, клещи)

Клещей и блох обрабатывают эфиром до обездвижения, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. После определения вида и пола материал может быть объединен в пулы в зависимости от вида, пола, места и даты сбора и помещен в сухие чистые пробирки объемом 1,5 мл.

Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.3012-12 "Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней". Блох помещают в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7-1,0 мл 0,15 моль раствора натрия хлористого и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 2 мин. для осветления пробы. ДНК/РНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

Клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96%-ного этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3 - 5 с при 2000 об/мин для удаления капель с крышки пробирки. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки. Вносят в пробирку 1 мл 0,15 моль раствора натрия хлористого, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3 - 5 с при 2000 об/мин. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой

пробы удаляют раствор натрия хлористого из пробирки. Переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7-1,0 мл 0,15 моль раствора натрия хлористого и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 2 мин. для осветления пробы. ДНК/РНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

9.11 Вода открытых водоемов

Пробы берутся в затененном месте, на глубине 10-20 см от поверхности стоячей или слабопроточной воды в объеме 100-200 мл в стерильные емкости объемом 200-250 мл с закручивающейся крышкой. Из одной точки берут 2 пробы. Для концентрирования бактериальных клеток используют либо дробное центрифугирование, либо вакуумную фильтрацию.

Для дробного центрифугирования из пробы воды переносят по 35 мл в 3 (6) центрифужные пробирки с винтовой горловинной крышкой типа Falcon объемом 50 мл и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Осадок в каждой пробирке ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Из центрифужных пробирок переносят полученную суспензию в микроцентрифужную пробирку с закручивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

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

9.12 Почва, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин при 5000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок суспендируют в 0,2-0,5 мл дистиллированной воды и используют для выделения ДНК/РНК.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-анализ состоит из следующих этапов: обеззараживание материала, выделение ДНК/РНК; обработка ДНКазой, обратная транскрипция, амплификация, регистрация и учет результатов.

10.1. Обеззараживание материала

Обеззараживание материала проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

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

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

10.2. Выделение ДНК/РНК

Выделение ДНК/РНК осуществляют с использованием коммерческих наборов «Рибо-сорб», «Рибо-преп» или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к наборам, начиная с этапа добавления нуклеосорбента/раствора для преципитации.

10.3. Обработка ДНКазой

Из морозильной камеры извлекают ДНКазу, реакционный буфер для ДНКазы, стоп-буфер для ДНКазы, воду, свободную от нуклеаз, полностью оттаивают, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 30 с для осаждения капель со стенок пробирок. Для каждой исследуемой пробы в отдельной микропробирке объемом 0,6 мл собирают реакционную смесь из расчета: выделенный препарат ДНК/РНК – 5 мкл; реакционный буфер для ДНКазы – 1 мкл; ДНКаза – 1 мкл; вода, свободная от нуклеаз – 3 мкл. Микропробирки с собранной реакционной смесью инкубируют в твердотельном термостате при температуре 37°C в течение 30 минут. Затем в каждую микропробирку добавляют по 1 мкл стоп-буфера для ДНКазы и инкубируют при температуре 65°C в течение 10 минут. Микропробирки оставляют в штативе при комнатной температуре на 5-10 минут для охлаждения, после чего полученные пробы используют для проведения обратной транскрипции.

10.4. Проведение обратной транскрипции

Обратную транскрипцию проводят с использованием коммерческих наборов «Реверта», «Реверта-L» или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к наборам.

10.5. Проведение ПЦР – амплификация ДНК

Из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь 1, ПЦР-смесь 2, из морозильной камеры - Таq-полимеразу, ПКО ДНК *Y. pestis*, ПКО ДНК *F. tularensis*. ПКО ДНК *Y. pestis* и ПКО ДНК *F. tularensis* полностью оттаивают, перемешивают 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 микропробирок объемом 0,2 мл, из расчета числа исследуемых проб, ОКВ и 3 контролей – двух положительных и одного отрицательного.

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

Реагент	Объем, мкл
ПЦР-смесь-1	5
ПЦР-смесь-2	10
Таq ДНК-полимераза	0,2

Подготовленную смесь тщательно перемешивают и переносят по 15 мкл в подготовленные пробирки объемом 0,2 мл.

Затем в пробирки вносят по 10 мкл кДНК из исследуемых проб и ОКВ. В микропробирку с отрицательным контролем амплификации (К-) вносят 10 мкл ТЕ-буфера, в микропробирки с положительными контролями амплификации (К+) – по 10 мкл ПКО

ДНК *Y. pestis* и ПКО ДНК *F. tularensis*. Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа RotorGene.

Программирование амплификатора:

Для работы с прибором «Rotor-Gene 3000» используют программу «Rotor-Gene 6», с прибором «Rotor-Gene 6000» или «Rotor-Gene Q» - 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».
 3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
 4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
 5. Выбирают объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска».
 6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
 7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
 8. Задают следующие параметры эксперимента:
 - 8.1. Hold/Удерж. температуры 95 °C - 15 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
56 °C - 20 с - Детекция
72 °C - 20 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.
- Флуоресценцию измеряют при 56 °C (во втором блоке циклирования) по каналам FAM/Green и JOE/Yellow.

- 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 красителей FAM/Green и JOE/Yellow 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 реакционной смесью. Помечают галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывают окно *Auto Gain Calibration Setup*/Авто-оптимизация уровня сигнала, нажимают кнопку «Close»/«Закреть». Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт».
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 пробы и контроли обозначают меню *Samples*/Образцы как *Unknown*/Неизвестный.

11. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green:

Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», 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» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
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) – 10 %.
5. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.
6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow:

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» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
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) – 10 %.
5. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.
6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

12. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Пороговое значение Ct для положительных проб по каналам FAM и JOE составляет не более 33. Если значение (Ct) более 33, требуется повторить ПЦР. Если при повторном исследовании получено значение (Ct) не более 33, результат считают положительным. При повторном получении значения (Ct) более 33, требуется повторить весь анализ, начиная с этапа подготовки проб.

К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительного (К+), отрицательного (К-) контролей амплификации и ОКВ.

Контроли	Значения порогового цикла (Ct)	
	по каналу FAM (Green)	по каналу JOE (Yellow)
K+ <i>Yersinia pestis</i>	≤ 33	Отсутствие флуоресценции
K+ <i>Francisella tularensis</i>	Отсутствие флуоресценции	≤ 33
K-	Отсутствие флуоресценции	Отсутствие флуоресценции
OKB	Отсутствие флуоресценции	Отсутствие флуоресценции

Для учета результатов реакции используют приведенную ниже таблицу

Пробы	Значения порогового цикла (Ct)		Результат анализа
	по каналу FAM (Green)	по каналу JOE (Yellow)	
Исследуемые пробы	≤ 33	≤ 33	В пробе выявлена РНК <i>Y. pestis</i> и <i>F. tularensis</i>
	≤ 33	Отсутствие флуоресценции	В пробе выявлена РНК <i>Y. pestis</i>
	Отсутствие флуоресценции	≤ 33	В пробе выявлена РНК <i>F. tularensis</i>
	Отсутствие флуоресценции	Отсутствие флуоресценции	В пробе РНК <i>Y. pestis</i> или <i>F. tularensis</i> не обнаружена

13. - АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять РНК *Y. pestis* и/или *F. tularensis* в суспензии концентрацией не менее 1×10^3 м.к./мл.

13.2. Аналитическая специфичность.

Набор не должен давать положительных результатов с РНК микроорганизмов других родов в суспензиях концентрацией 1×10^4 м.к./мл

13.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 % при исследовании 250 положительных образцов, содержащих *Y. pestis* и/или *F. tularensis* в концентрации не менее 1×10^3 м.к./мл.

13.4. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 % при анализе 250 проб, содержащих бактериальные суспензии *Y. pestis* и/или *F. tularensis* в концентрации 1×10^3 м.к./мл и 60 проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации 1×10^4 м.к./мл.

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

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

15. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Набор реагентов для выявления РНК *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* / *Francisella tularensis* индикация – РГФ)» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

Производитель - Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46 Тел. (845-2) 51-69-65).

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

Генеральный директор
ООО «Вымпел-медцентр»



А.К.Никифоров

Ю.Н.Егоров



2 ИЮН 2015

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 12 ЛИСТОВ
«22» ИЮН 2015 — 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

