

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФКУЗ РосНИИЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора
Кутырев В.В.
« 30 » 11 2018 г.

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
(БРУ-ДИФ-РГФ)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени «Бру-Диф-РГФ» по ТУ 21.20.23-055-01898109-2018», далее по тексту – набор реагентов «Бру-Диф-РГФ» предназначен для выявления ДНК возбудителя бруцеллеза в клиническом материале (кровь, сыворотка крови, синовиальная жидкость, пунктаты из лимфатических узлов), биологическом материале (кровь, селезенка, печень, легкое, сердце, лимфатические узлы, плацента и плодовые оболочки от абортировавших плодов, околоплодная жидкость, содержимое бурс, гигром, лимфатические узлы, печень, селезенка, матка, семенники от животных с подозрением на бруцеллез), объектах окружающей среды (вода, почва, пищевые продукты: непастеризованное молоко, сметана, сыр, творог) с одновременным определением его принадлежности к видам *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

Бруцеллез - это зоонозное инфекционно-аллергическое заболевание, характеризующееся интоксикацией, поражением опорно-двигательного аппарата, нервной и половой системы.

Основным источником являются больные сельскохозяйственные животные. Заболевания людей преимущественно вызывают бруцеллы коз и овец (*Brucella melitensis*), бруцеллы крупного рогатого скота (*Brucella abortus*), свиней (*Brucella suis*), реже - прочие виды.

Заражение происходит алиментарным путем (при употреблении молочных продуктов), через микроповреждения кожи (во время помощи при отелах, ягнении и т.д.), аэрогенным путем (при вдыхании пыли, содержащей бруцеллы, в местах выпаса, в загонах для содержания овец, в лабораторных условиях).

Размножение и накопление микробов происходит преимущественно в лимфатических узлах, из которых бруцеллы периодически поступают в кровь. Возбудитель гематогенно распространяется по всему организму, приводит к аллергической перестройке организма (характерна гиперчувствительность замедленного типа) и формированию очагов в различных органах и системах.

ЗАМ. ДИРЕКТОРА

ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ

И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ

А. К. НИКИФОРОВ

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования материала, полученного от лиц обоего пола любого возраста с подозрением на бруцеллез вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также в ходе эпидемиологического мониторинга для исследования биологического материала от животных с подозрением на бруцеллез, абортированных плодов, объектов окружающей среды и пищевых продуктов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

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

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 7 реагентов:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-1	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры, зонды, дНТФ и натрия азид	0,25	1 пробирка
ПЦР-смесь-2	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры, зонды, дНТФ и натрия азид	0,25	1 пробирка
ПЦР-смесь-РГФ	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl; калия хлорид; магния хлорид; Tween-20, глицерин; натрия азид	0,5	2 пробирки
Тaq ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая фермент с активностью 5 ед/мкл	0,040	1 пробирка
ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl; Na ₂ -ЭДТА	1,0	3 пробирки
Растворитель	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой Н ₂ О, свободную от нуклеаз	1,0	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Brucella</i>	Образец ДНК <i>B. suis</i> сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки

Набор реагентов «Бру-Диф-РГФ» рассчитан на 50 определений, включая положительные и отрицательные контроли.

В основу метода положен анализ наличия или отсутствия фрагментов генома у разных видов *Brucella* spp. методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

Для идентификации и определения видовой принадлежности бруцелл исследования проводят с ПЦР-смесью-1 (содержит праймеры и зонды, специфичные к генам *bcspr31*, *BRA0420*, *BRA0907*) и ПЦР-смесью-2 (содержит праймеры и зонды, специфичные к генам *BME11426*, *BME110711*, *BME10994*). Реакцию амплификации осуществляют одновременно с каждой ПЦР-смесью.

Подтверждение наличия в пробе ДНК *Brucella* spp. осуществляют на основании наличия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагмента гена *bcs31* (канал FAM).

Подтверждение наличия в пробе ДНК вида *B. abortus* осуществляют на основании отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагмента гена *BRA0420* (канал ROX), наличия амплификации с остальными ДНК-мишенями.

Подтверждение наличия в пробе ДНК вида *B. melitensis* осуществляют на основании отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-1 фрагмента гена *BRA0907* (канал JOE), наличия амплификации с остальными ДНК-мишенями.

Подтверждение наличия в пробе ДНК вида *B. suis* осуществляют на основании наличия амплификации с ПЦР-смесью-1, ПЦР-смесью-2 со всеми ДНК-мишенями.

Подтверждение наличия в пробе ДНК вида *B. canis* осуществляют на основании отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена *BME11426* (канал FAM) и наличия амплификации с остальными ДНК-мишенями.

Подтверждение наличия в пробе ДНК вида *B. ovis* осуществляют на основании отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена *BME10994* (канал ROX), наличия амплификации с остальными ДНК-мишенями.

Подтверждение наличия в пробе ДНК вида *B. neotomae* осуществляют на основании отсутствия амплификации с ПЦР-смесью-2 фрагмента гена *BME10711* (канал JOE) и наличия амплификации с остальными ДНК-мишенями.

Проведение анализа включает два этапа: 1. выделение ДНК из проб клинического и биологического материала, объектов окружающей среды, пищевых продуктов 2. амплификация с «ПЦР-смесью-1» и «ПЦР-смесью-2» на приборах типа Rotor Gene и CFX. Тип используемых зондов – TaqMan. 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. Учет результатов флуоресценции проводят по каждому каналу отдельно.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять ДНК *Brucella* spp. в суспензиях концентрацией не менее 1×10^3 м.к./мл и определять принадлежность патогена к основным шести видам бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*.

3.2. Аналитическая специфичность

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

3.3. **Диагностическая чувствительность** - не менее 99,5% с доверительной вероятностью 90%; при анализе 432 положительных проб (120 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 96 проб клинического материала, 120 проб биологического материала и 96 проб объектов окружающей среды), содержащих *Brucella* spp. в концентрации 1×10^3 м.к./мл, получен положительный результат с верной дифференциацией по принадлежности к видам *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* – 99,5 % - в 430 случаях.

3.4. **Диагностическая специфичность** - не менее 98,0% с доверительной вероятностью 90%; при исследовании 144 отрицательных проб (40 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 32 проб клинического материала, 40 проб биологического материала и 32 проб объектов окружающей среды), содержащих гетерологичные микроорганизмы *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Klebsiella*

pneumonia, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella ser. typhimurium, Shigella flexneri, Staphylococcus aureus, Yersinia pseudotuberculosis в концентрации 1×10^7 м.к./мл, получен отрицательный результат в 144 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.

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.

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

4.2. Информация об экологических рисках.

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

4.3. 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.

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

- Использование набора реагентов «Бру-Диф-РГФ» 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*:

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа RotorGene	Амплификатор «RotorGene 3000», «RotorGene 6000», «RotorGene Q», «Qiagen», Германия
Амплификатор типа CFX	Амплификатор CFX 96 «БиоРад», США
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
Дозатор 0,5 – 10 мкл	Biohit, Финляндия
Дозатор 10 – 100 мкл	Biohit, Финляндия
Дозатор 20 – 200 мкл	Biohit, Финляндия
Дозатор 100 – 1000 мкл	Biohit, Финляндия
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 2012/11892 «Ахуген», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Ахуген», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Ахуген», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «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.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследования служат (МУК 4.2.3010-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза»):

- пробы культур микроорганизмов: бактериальные суспензии культур бруцелл или подозрительных изолятов;
- пробы клинического материала: кровь, сыворотка крови, синовиальная жидкость, пунктаты из лимфатических узлов;
- пробы биологического материала: кровь, селезенка, печень, легкое, сердце, лимфатические узлы, плацента и плодовые оболочки от абортировавших плодов, околоплодная жидкость, содержимое бурс, гигром, лимфатические узлы, печень, селезенка, матка, семенники от животных с подозрением на бруцеллез;
- пробы объектов окружающей среды: вода, почва, пробы пищевых продуктов: непастеризованное молоко, сметана, сыр, творог.

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, либо в сосуде Дьюара с жидким азотом - длительно.

С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды следующего состава: сахароза - 0,218 моль; KH_2PO_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.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала:

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови и гноя может приводить к ингибированию реакции амплификации.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

Проведение анализа включает следующие этапы: подготовка проб исследуемого материала, обеззараживание материала, выделение ДНК; амплификация, регистрация и учет результатов.

7.1. Подготовка исследуемых образцов

7.1.1. Подготовка проб культур микроорганизмов

Из культур бруцелл 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 $1,6 \times 10^9$ м.к./мл для *Brucella spp.* Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^3 м.к./мл. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают суспензии клеток чистой культуры в

количестве 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

7.1.2. Подготовка проб клинического материала

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. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл клинического материала. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Сыворотка крови

Кровь у людей берут из локтевой вены в количестве 4,5 мл стерильным шприцем в вакуумную пробирку с активатором сыворотки, оставляют пробирку в вертикальном положении до образования сыворотки. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл клинического материала. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Синовиальная жидкость, пунктаты из лимфатических узлов

Синовиальная жидкость, пунктаты из лимфатических узлов берут шприцем емкостью не менее 5 мл. Кожу на участке, намеченном для прокола, обрабатывают 70 % спиртом, а затем смазывают 5 % раствором йода и вновь протирают 70 % спиртом. 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.

7.1.3. Подготовка проб биологического материала

Органы животных

Органы 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 0,2-0,5 мл ТЕ-буфера или 0,9 % растворе натрия хлористого и используют для выделения ДНК.

7.1.4. Подготовка проб из объектов окружающей среды

Вода

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

Почва

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы 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 ТЕ-буфера или 0,9 % растворе натрия хлористого и используют для выделения ДНК.

Молоко

Пробы молока в количестве 10 мл отбирают в отдельную пробирку и центрифугируют в течение 10 мин при 3500 об/мин. Для исследования в отдельную

микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл надосадочной жидкости. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Пищевые продукты (сметана, творог, сыр)

Пищевые продукты в количестве 1 г помещают в стерильную ступку, добавляют 0,9%-ный раствор натрия хлорида в соотношении 1:10 и растирают до однородного состояния. Отстаивают и через ватный тампон в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают 100 мкл надосадочной жидкости. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

7.2 Обеззараживание материала

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

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

К исследуемым образцам и ОКВ добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01%) с последующим прогреванием их при $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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, и инкубируют 15 минут при температуре $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

7.3 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб В» или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанным наборам. Для выделения ДНК из проб клинического и биологического материала, объектов окружающей среды рекомендуется использование наборов «ДНК-сорб В», «Рибо-сорб». **Важно!!!** Для выделения ДНК из проб пищевых продуктов (молоко, сливки, сыр, сметана, творог) используют только наборы для выделения ДНК/РНК, предусматривающие использование на этапах отмывки сорбента ацетона, например «Рибо-сорб».

7.4 Проведение ПЦР – амплификация ДНК

Важно !!! Исследования проводят одновременно с ПЦР-смесью-1» и «ПЦР-смесью-2».

7.4.1. Подготовка ПКО ДНК *Brucella* spp.

Перед началом работы готовят ПКО ДНК *Brucella* spp. Для этого в пробирку с сухим ПКО добавляют 100 мкл растворителя, выдерживают при комнатной температуре в течение 20-30 с, тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5-7 с и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки. После растворения ПКО ДНК *Brucella* spp. хранят при температуре минус 20°C .

7.4.2. Подготовка реакционных смесей

Из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь-1 и ПЦР-смесь-2, ПЦР-смесь-РГФ, ТЕ-буфер, из морозильной камеры извлекают Таq ДНК-полимеразу и ПКО ДНК *Brucella* spp. Пробирку с ПКО ДНК *Brucella* spp. полностью оттаивают, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки.

Определяют количество реакций в эксперименте из расчета: количество исследуемых проб, ОКВ, положительный контроль (К+) и отрицательный контроль (К-).

Для проведения реакции в штатив отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл для РС-1 и РС-2. Пробирки маркируют.

Важно!!! Если исследование выполняется с использованием амплификаторов CFX пробирки маркируют сбоку, так как учет флуоресценции на данном приборе осуществляется сверху.

В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционные смеси РС-1 и РС-2 из расчета, что на 1 реакцию необходимо:

Реакционная смесь	Реагент	Объем, мкл
РС-1	ПЦР-смесь-1	5
	ПЦР-смесь-РГФ	10
	Taq ДНК-полимераза	0,4
РС-2	ПЦР-смесь-2	5
	ПЦР-смесь-РГФ	10
	Taq ДНК-полимераза	0,4

Подготовленные смеси тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и вносят по 15 мкл подготовленных реакционных смесей в соответствующие микропробирки.

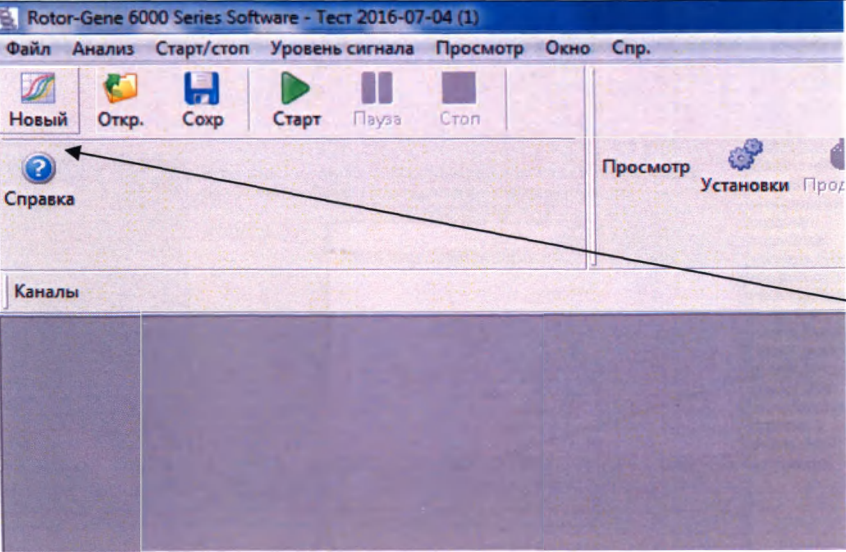
Затем в пробирки с РС-1 и РС-2 вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и ОКВ. В микропробирки с отрицательными контролями амплификации (K_1 - и K_2 -) вносят по 10 мкл ТЕ-буфера, в микропробирки с положительными контролями амплификации (K_1 + и K_2 +) – по 10 мкл ПКО ДНК *Brucella* spp.

7.4.3. Проведение термоциклирования

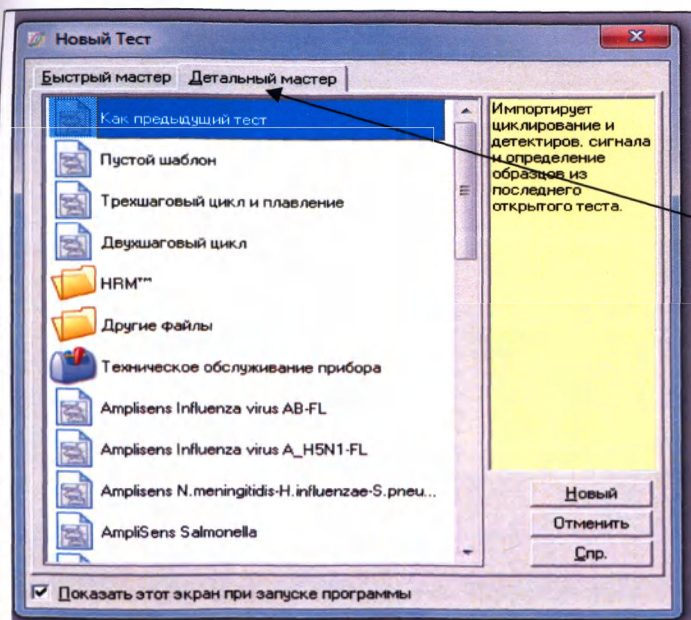
Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа RotorGene или CFX.

Программирование амплификатора типа RotorGene:

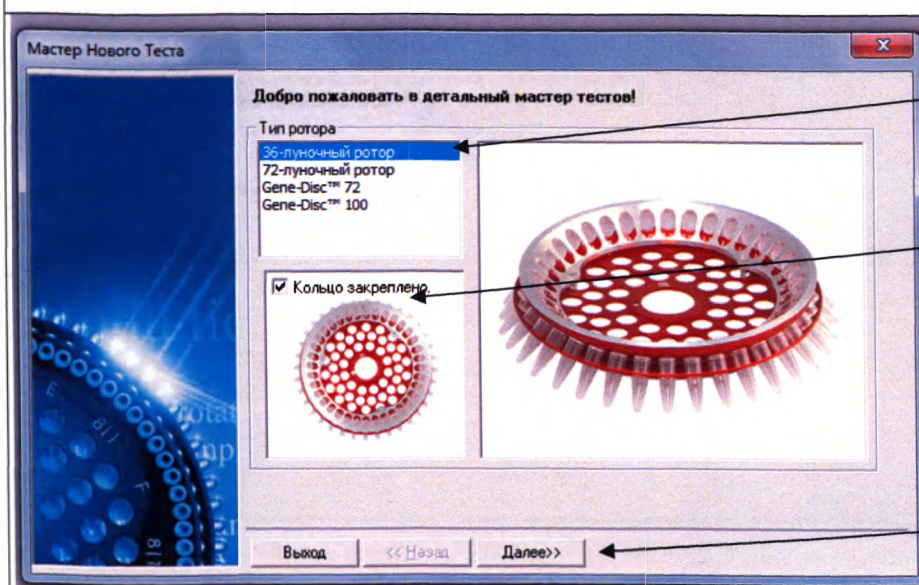
Для работы с прибором прибором «Rotor-Gene» 6000 и «RotorGene» Q- программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7 (build 67) или выше. При описании программы термины для каждой версии программы представлены следующим образом: для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы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



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

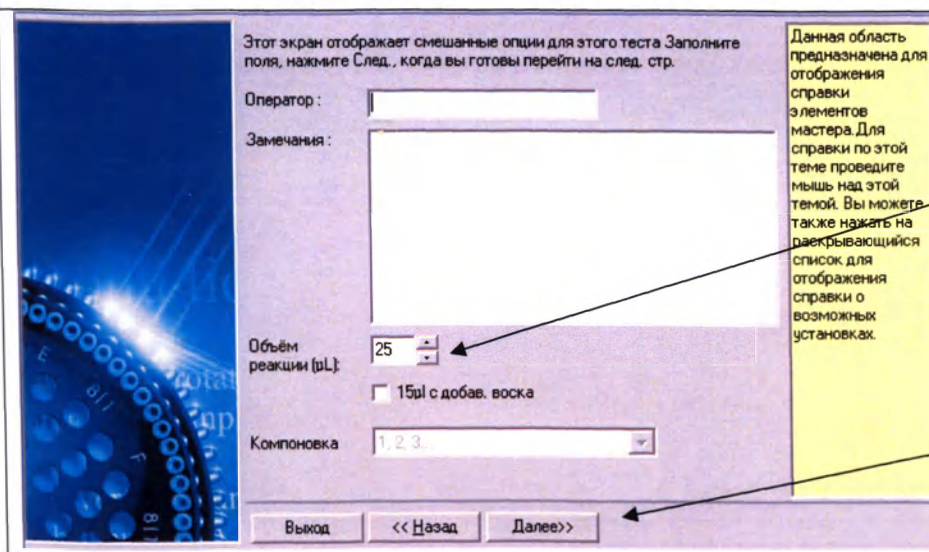


2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер». Нажимают кнопку «New»/«Новый».



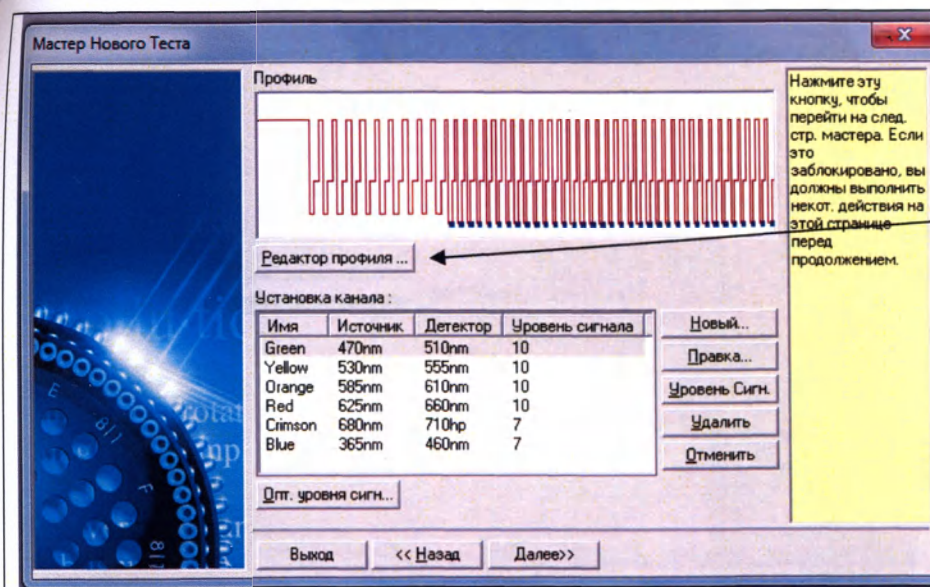
3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».

4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее»

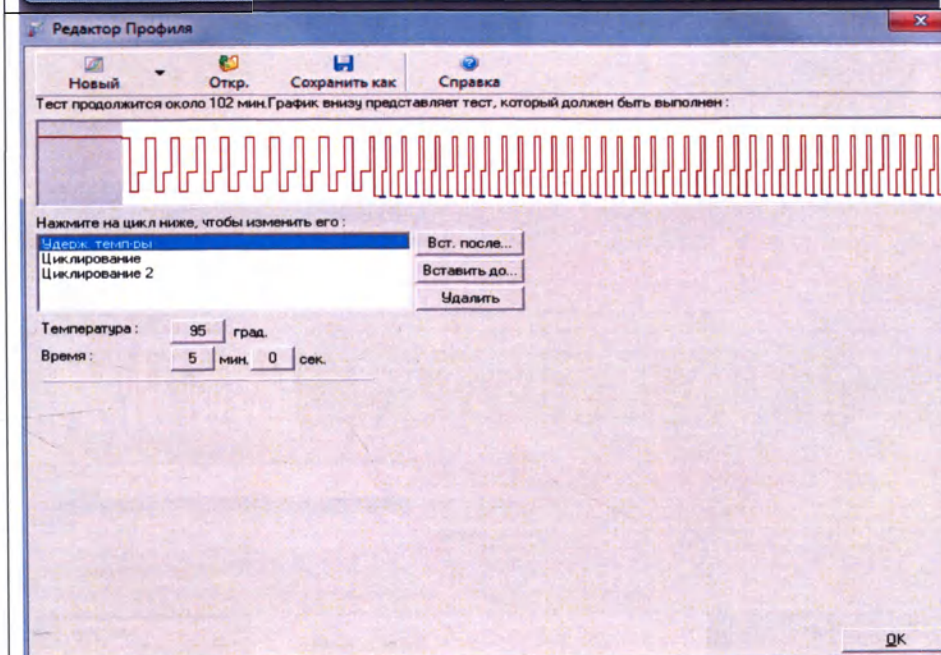


5. Выбирают объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл.

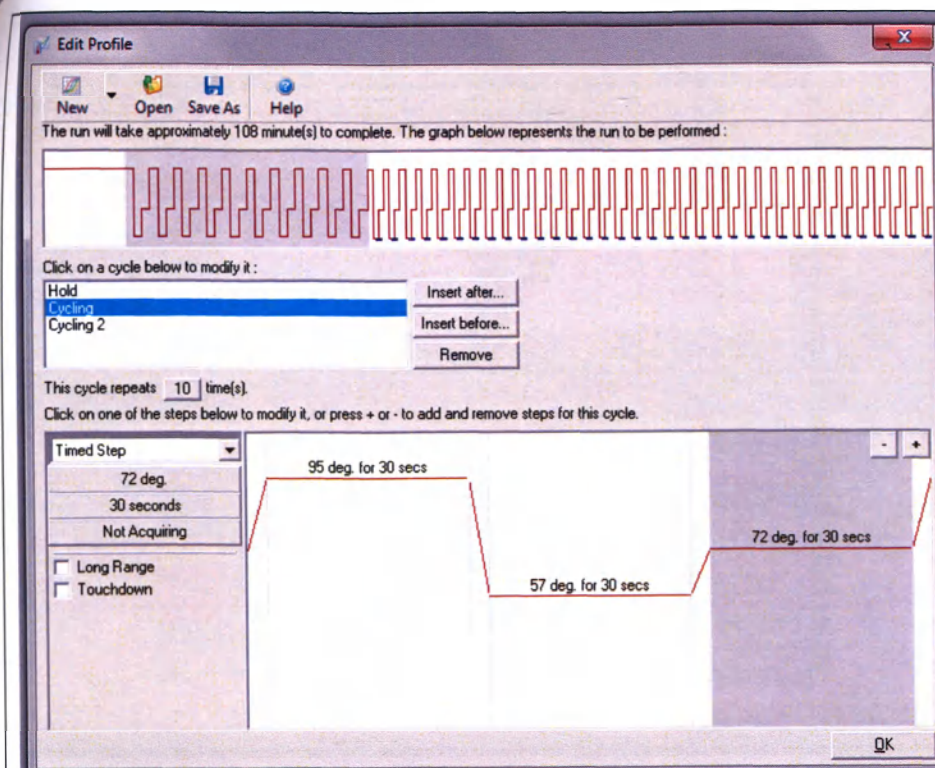
6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



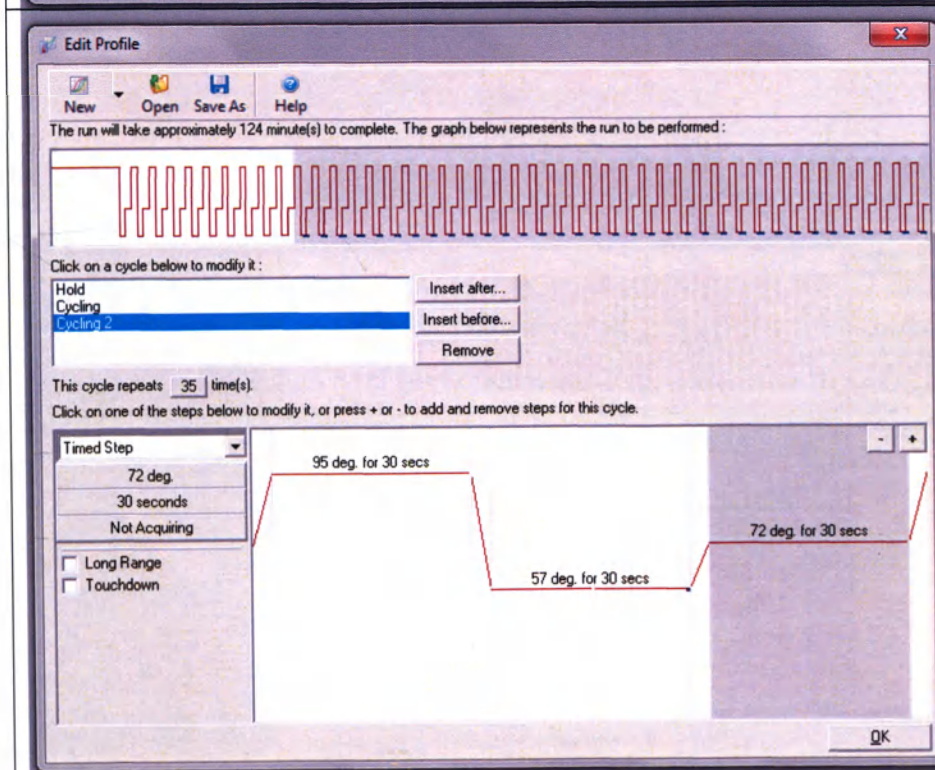
7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».



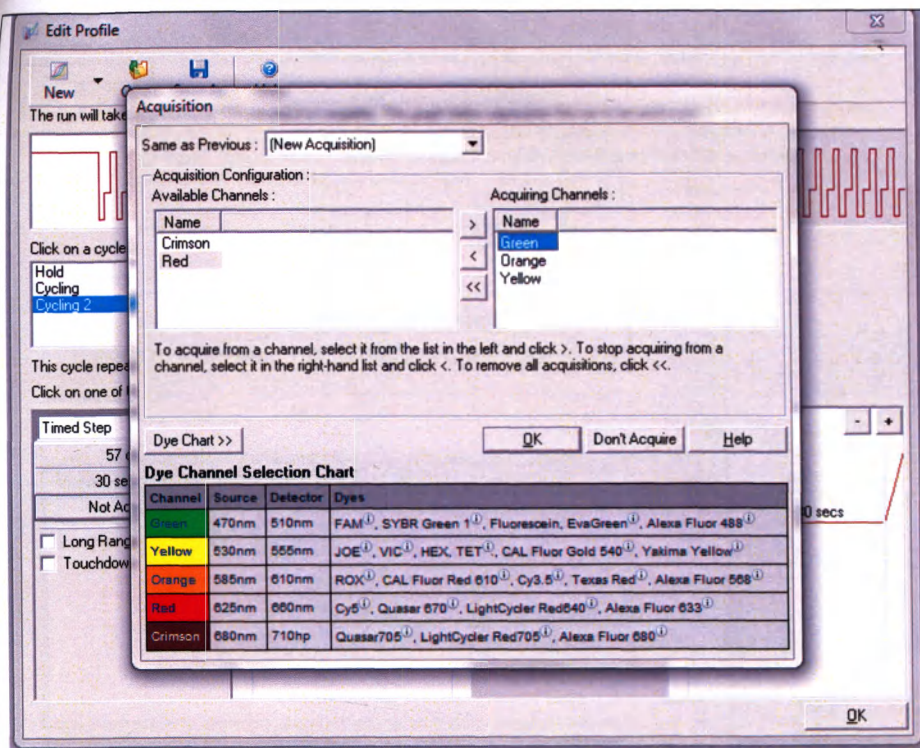
8. Задают следующие параметры эксперимента:
 8.1. Hold/Удерж. температуры 95 °C - 5 мин



8.2.Cycling/Циклирование
 95 °C - 30 с
 57 °C - 30 с
 72 °C - 30 с
 Cycle repeats/Цикл повторить — 10 times/раз.

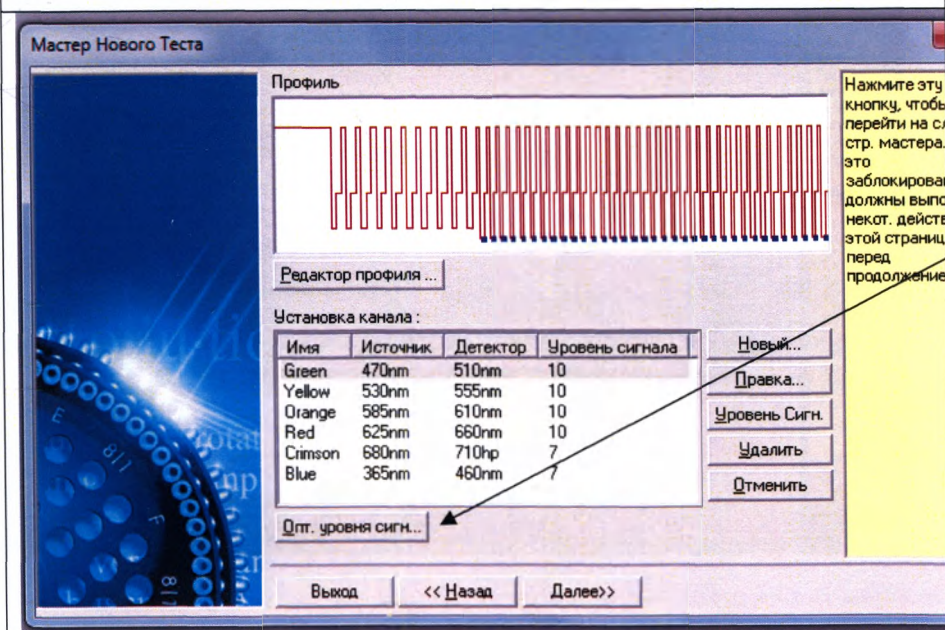


8.3.Cycling2/Циклирование2
 95 °C - 30 с
 57°C - 30 с
 72 °C - 30 с
 Cycle repeats/Цикл повторить — 35 times/раз.
 Нажимают кнопку «ОК»

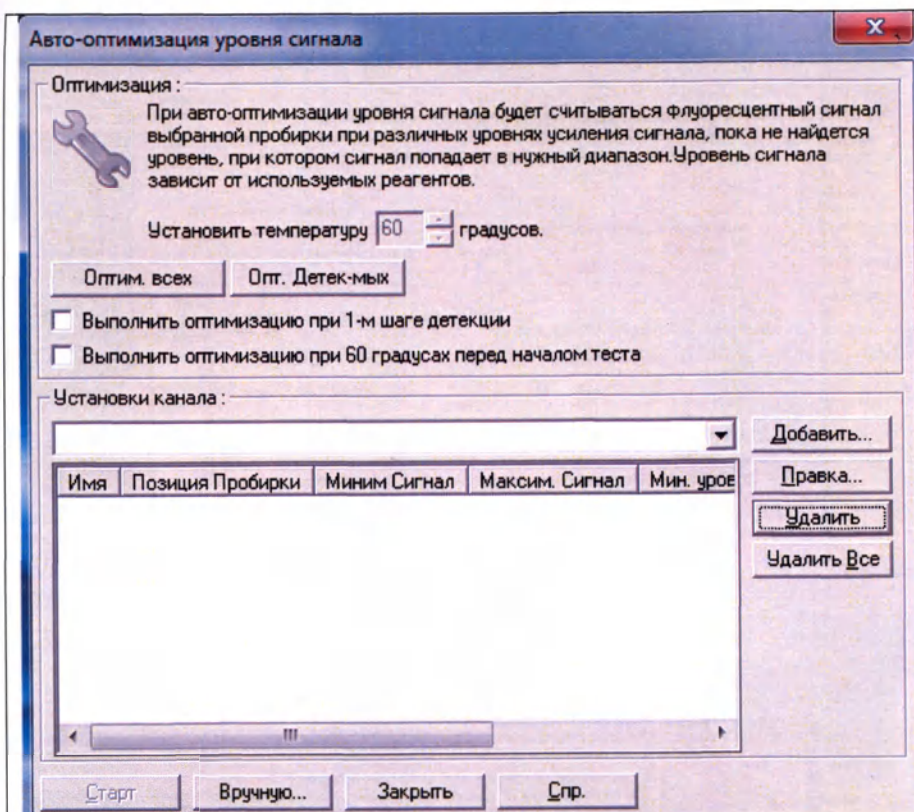


Флуоресценцию измеряют при 57 °C (во втором блоке циклирования) - нажимают кнопку Not acquiring/Не детектировать, выбирают стрелочками каналы FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, чтобы их обозначения были в правом окне Acquiring Channels/Детектировать каналы и нажимают кнопку «OK»

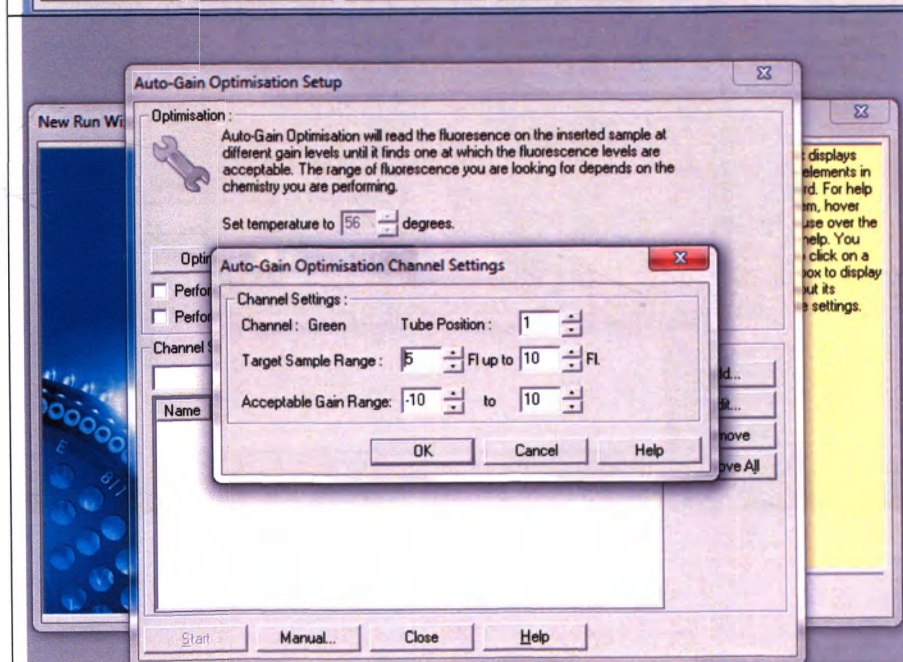
8.4. После закрытия окна Acquisition/Детекция сигнала нажимают кнопку «OK»



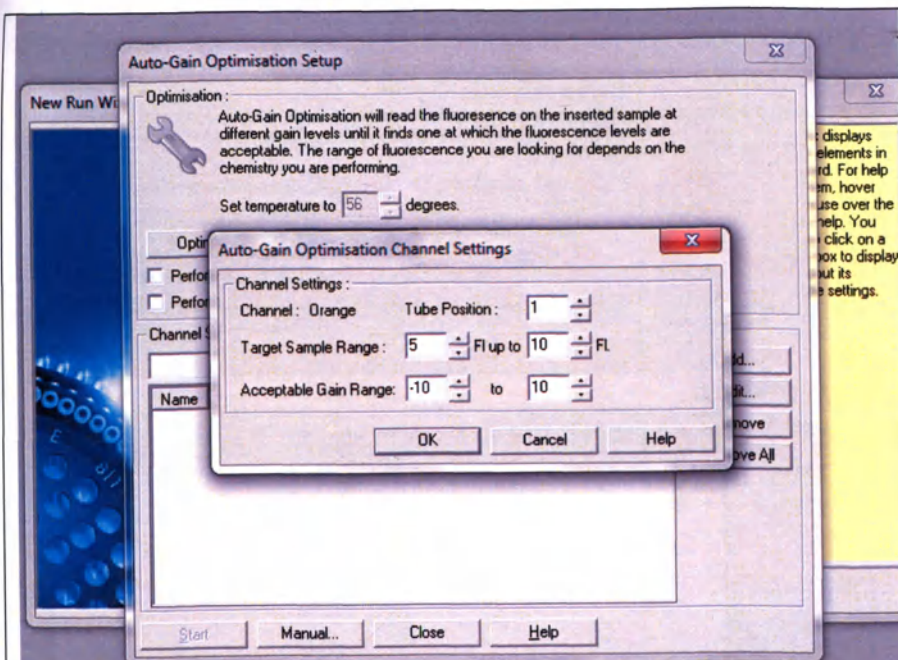
9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт. уровня сигн.».



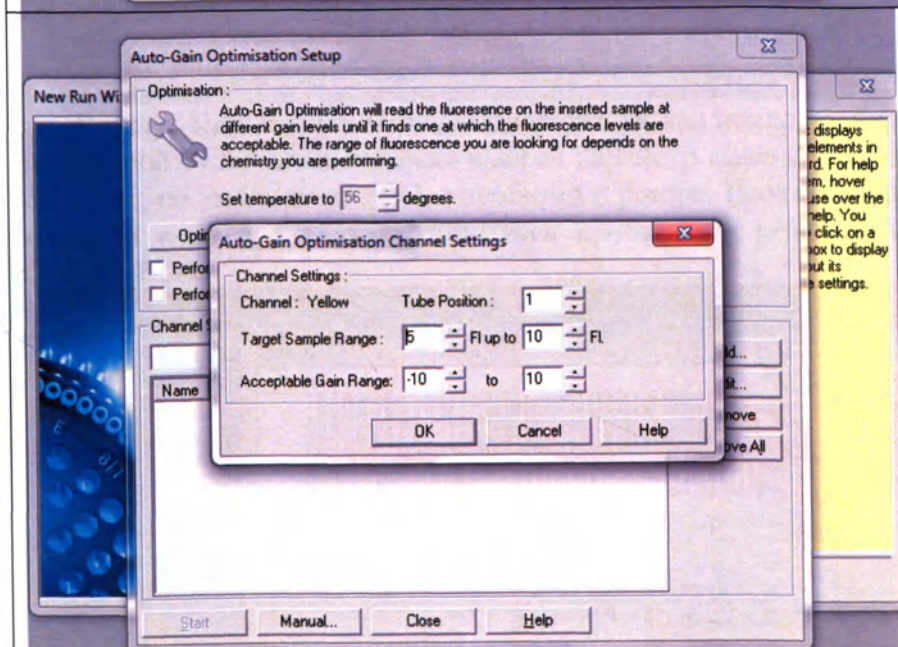
В открывшемся окне нажимают кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых».



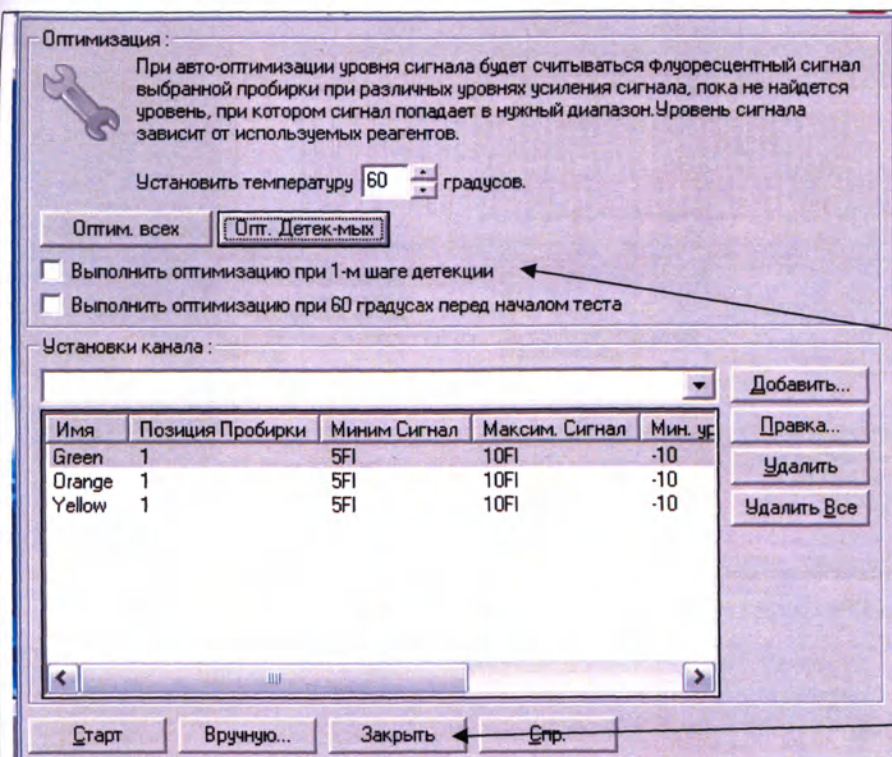
- для красителя **FAM/Green** указывают в графе *Min Reading/Миним.* Сигнал значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим.* Сигнал значение **10** Нажимают кнопку «OK»



- для красителя **ROX/Orange** указывают в графе *Min Reading/Миним.* **Сигнал** значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим.* **Сигнал** значение **10**. Нажимают кнопку «OK»



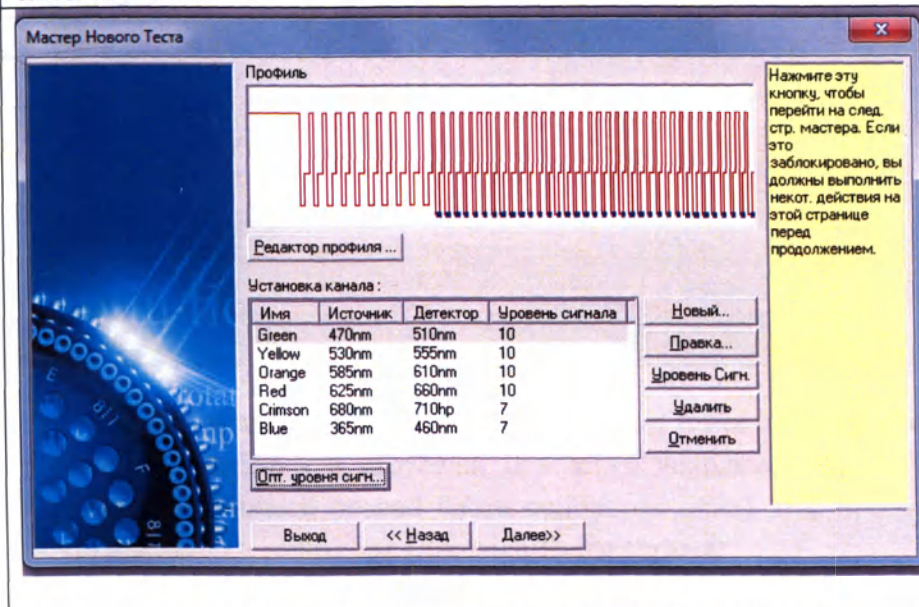
- для красителя **JOE/Yellow** указывают в графе *Min Reading/Миним.* **Сигнал** значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим.* **Сигнал** значение **10**. Нажимают кнопку «OK»



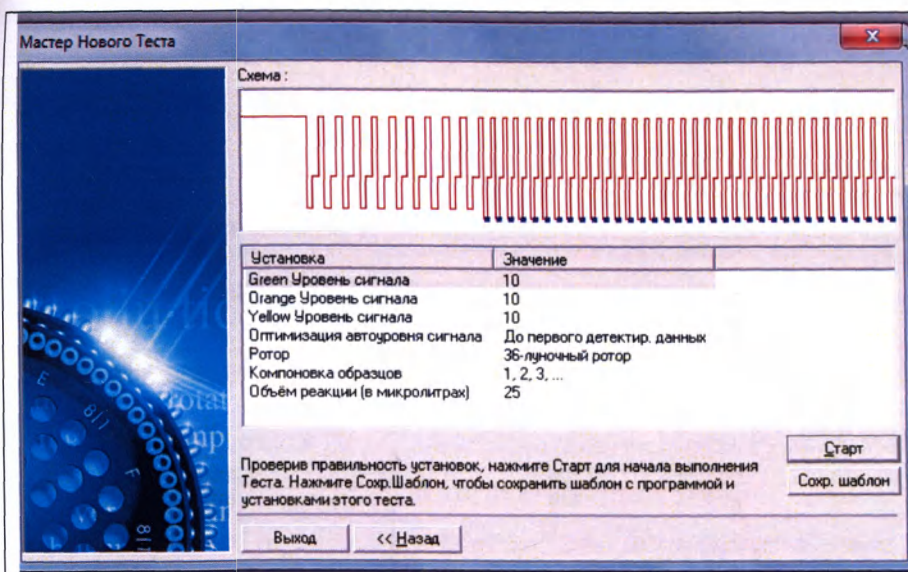
Помечают галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции».

Закрывают окно Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала, нажимают кнопку «Close»/«Закрывать».

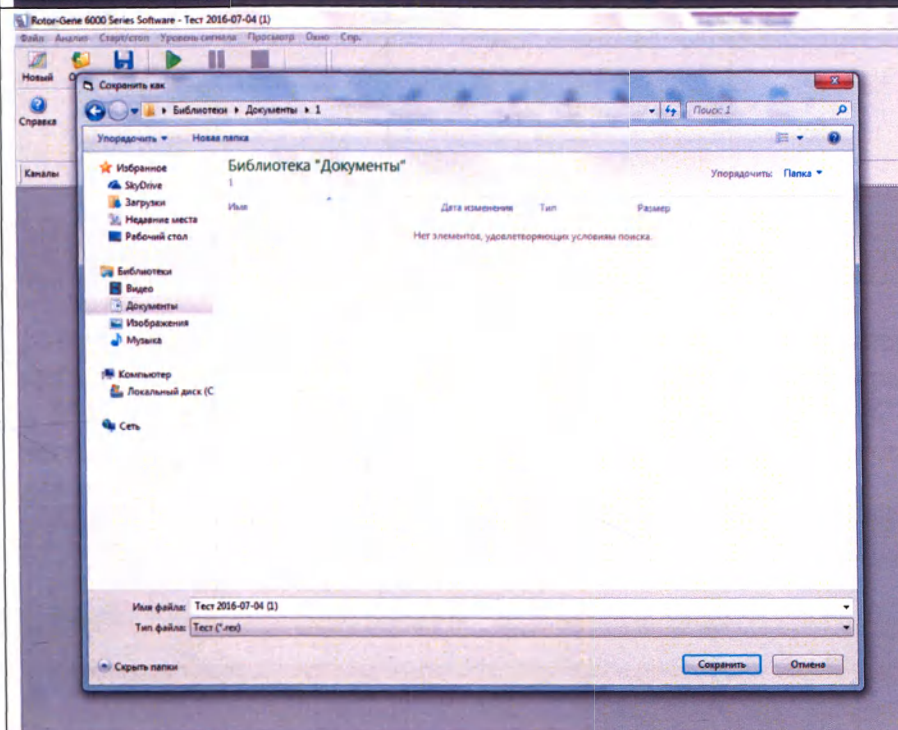
В графе Tube position/Позиция Пробирки указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью PC-1.



Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



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

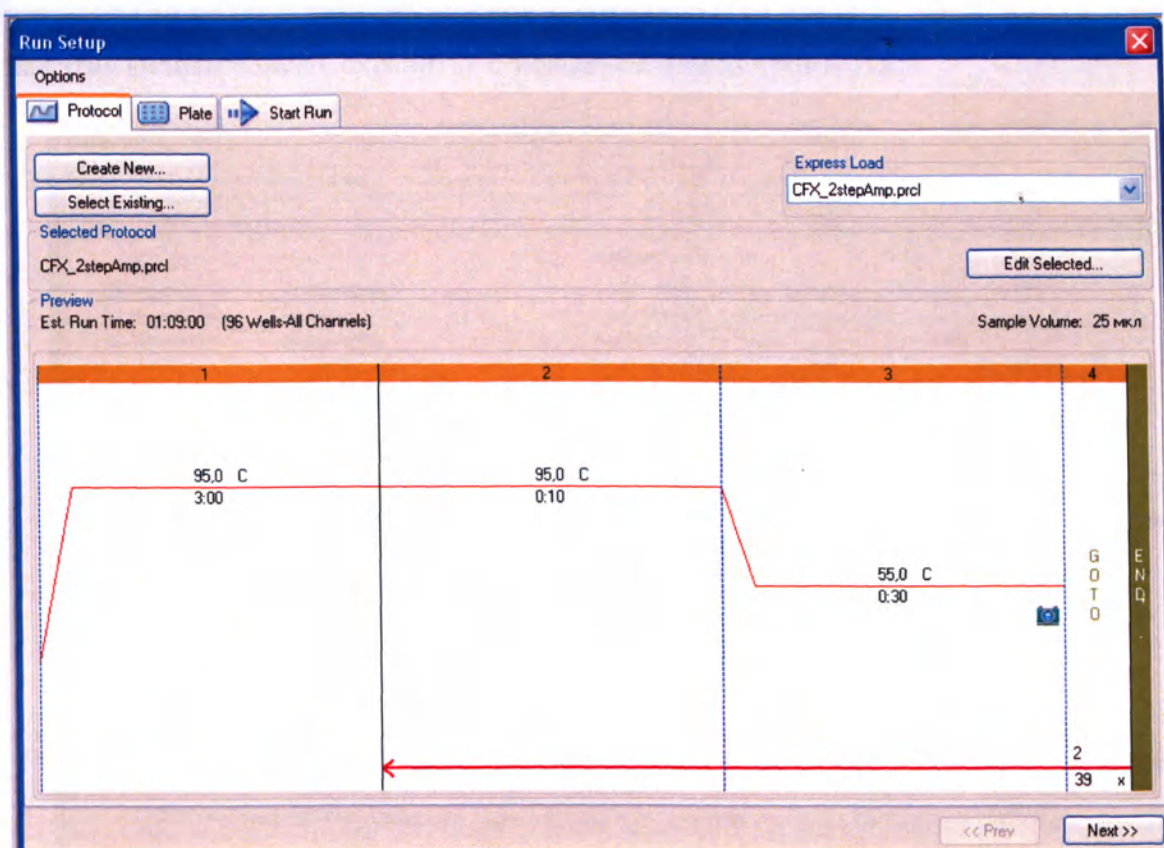


11. Дают название эксперимента и сохраняют его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

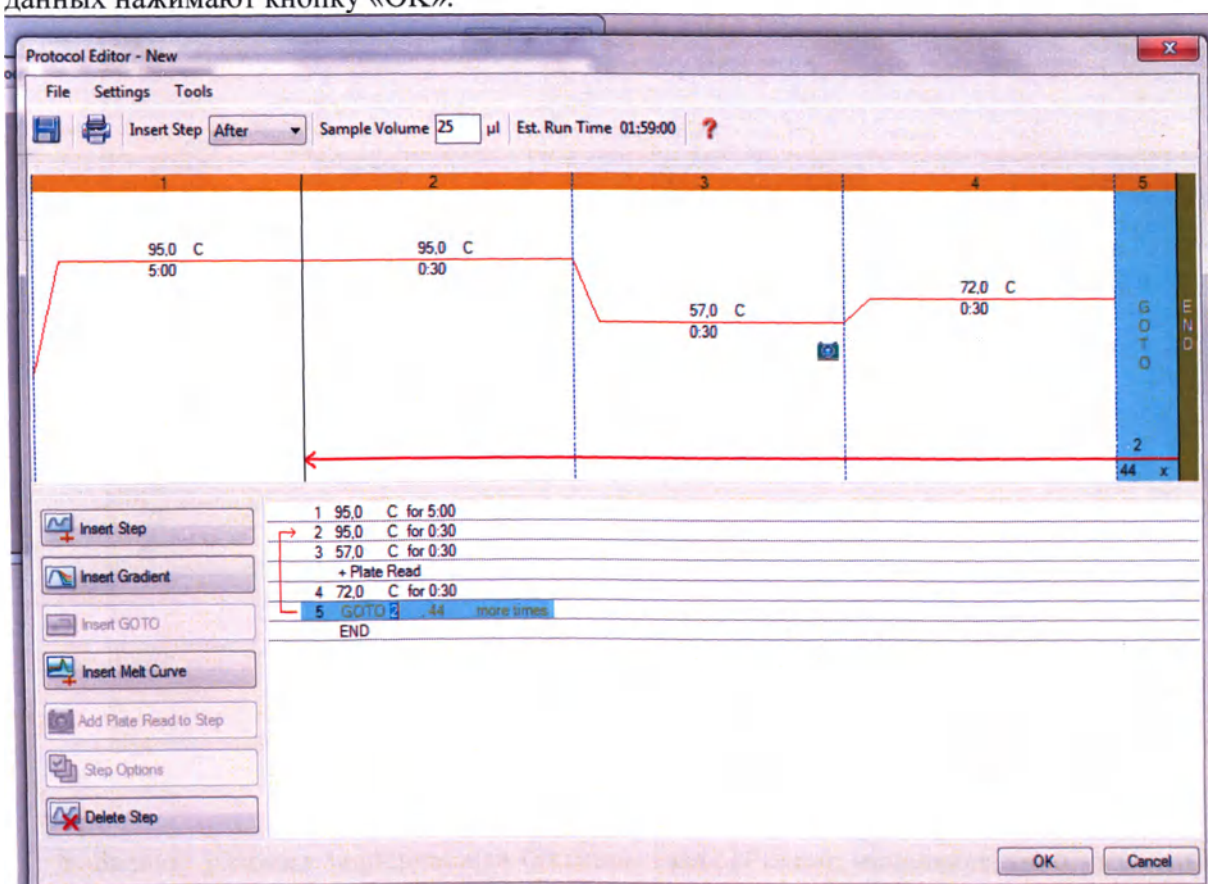
В процессе работы амплификатора или по окончании его работы программируют положение пробирок в карусели. Для этого используют кнопку «Edit samples»/«Правка образцов» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначают меню Samples/Образцы как Unknown/Неизвестный.

Программирование амплификатора типа CFX

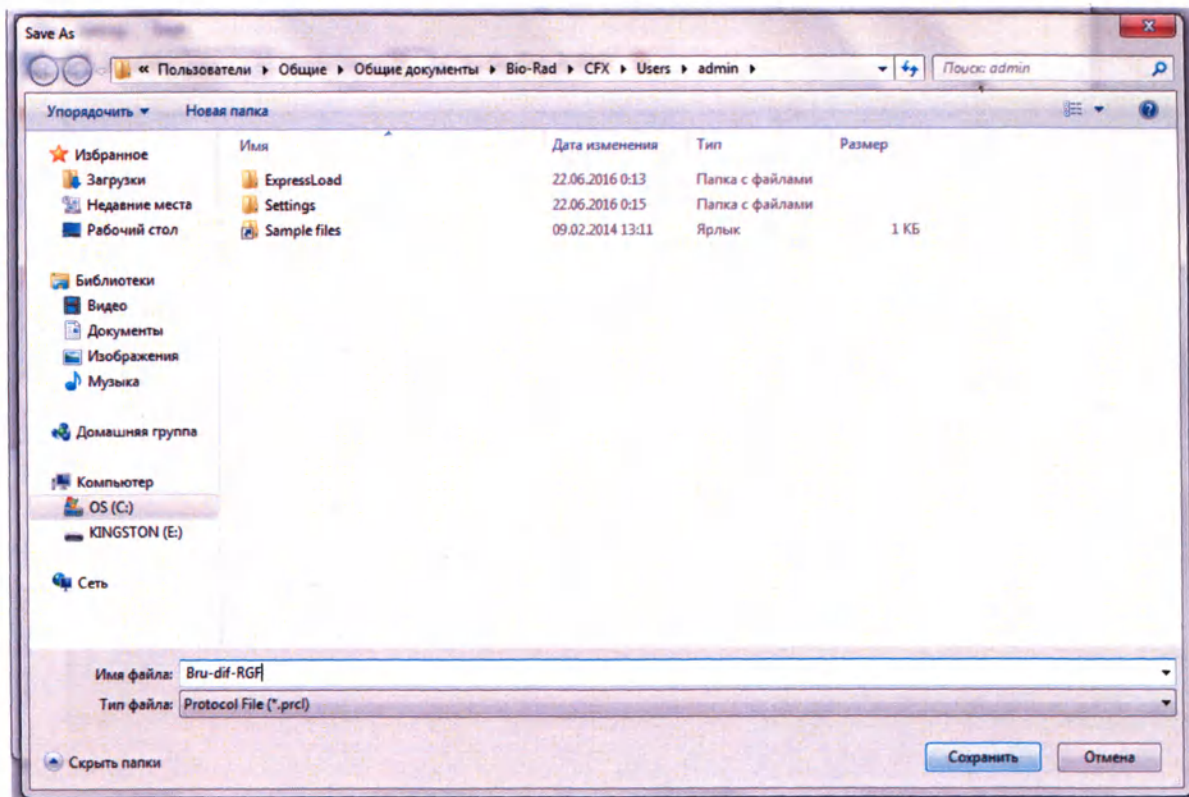
1. Включают прибор и ждут окончания автоматической калибровки прибора.
2. Запускают программу «CFX Manager».
3. Выбирают новый эксперимент «Create a New Run»/
4. Задают программу амплификации (активно окно «Protocol»), используя либо уже готовый шаблон – кнопка «Select Existing», либо создают новый – кнопка «Creative New».



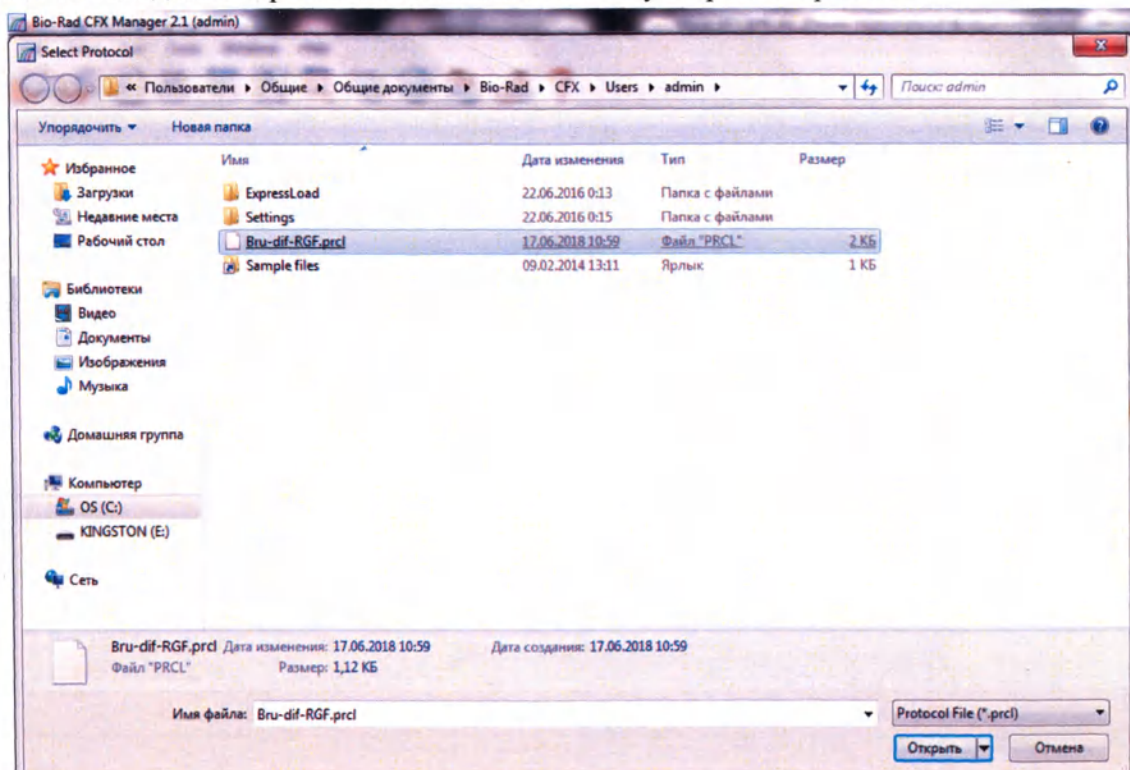
5. В случае создания нового шаблона вводят значения температуры и времени каждого шага, исходя из следующего: предварительная денатурация при 95 °C – 5 мин, 95 °C – 30 с, 57 °C – 30 с, вставка функция «Add Plate Read to Step», 72 °C – 30 с (вставка шага через кнопку «Insert Step»), вставка функции «GOTO» 2 – 44 цикла. После окончания ввода данных нажимают кнопку «OK».



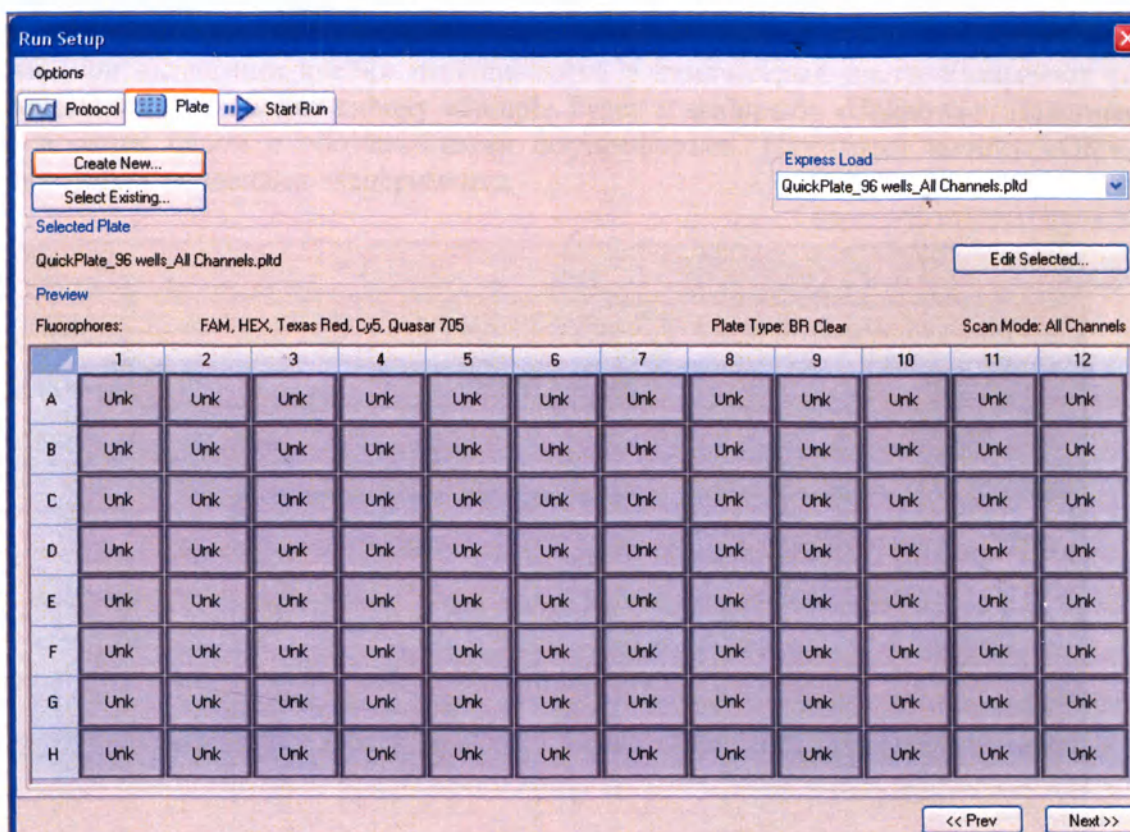
Для последующих исследований шаблон протокола может быть сохранен путем нажатия кнопки «Save/Сохранить» с указанием имени протокола.



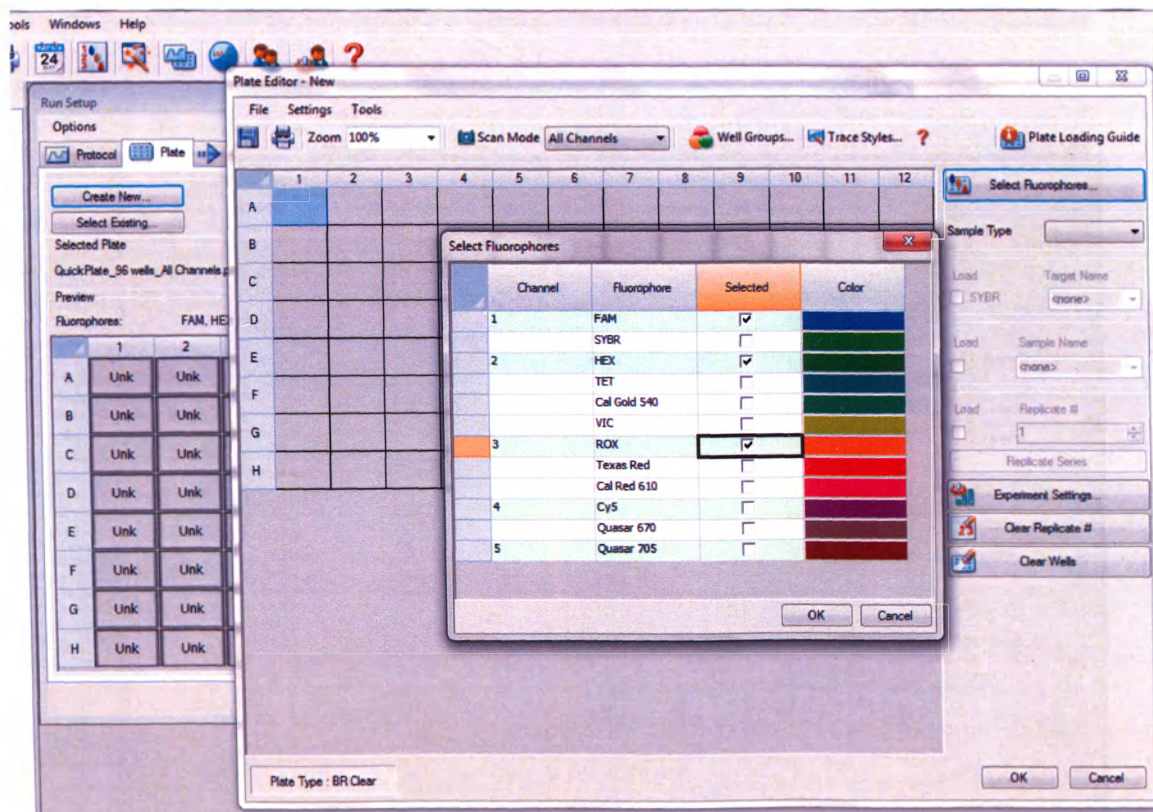
6. В случае использования готового шаблона нажимают кнопку «Select Existing», выбирают необходимый протокол и нажимают кнопку «Open/Открыть»



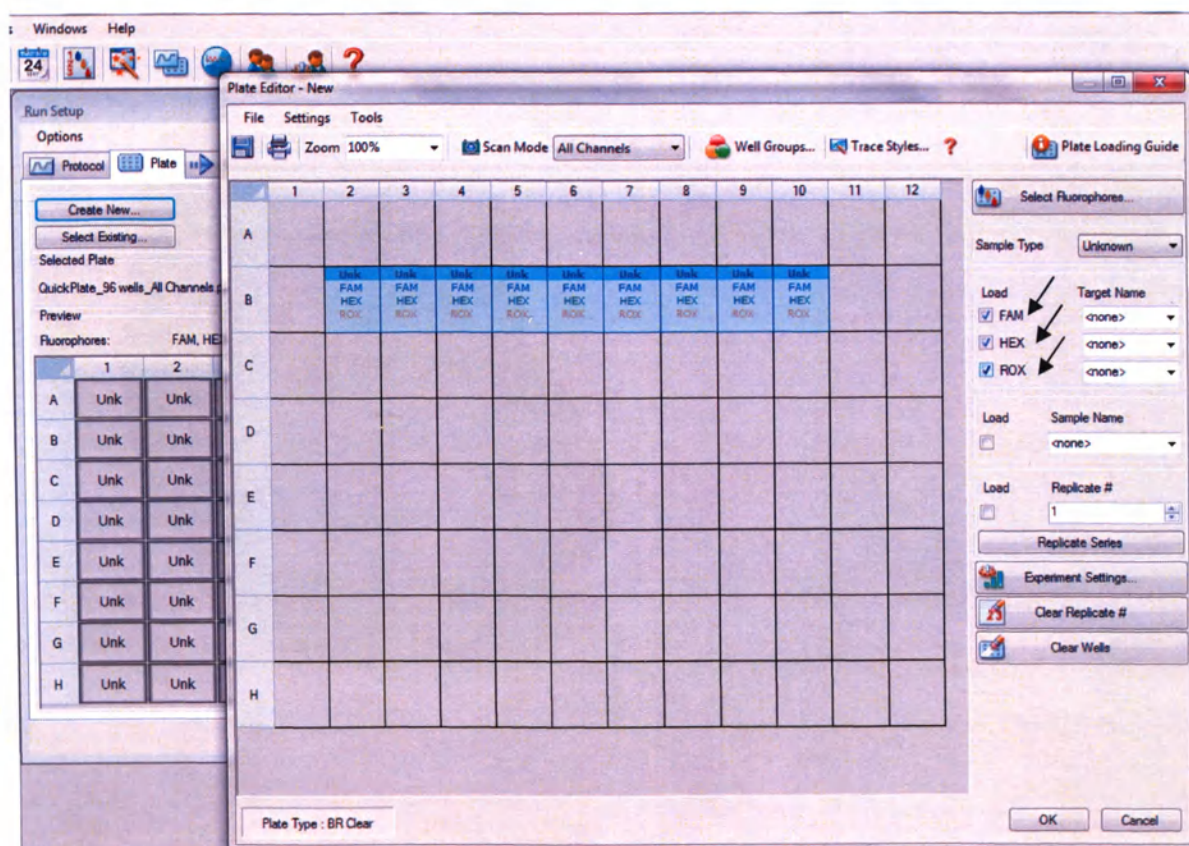
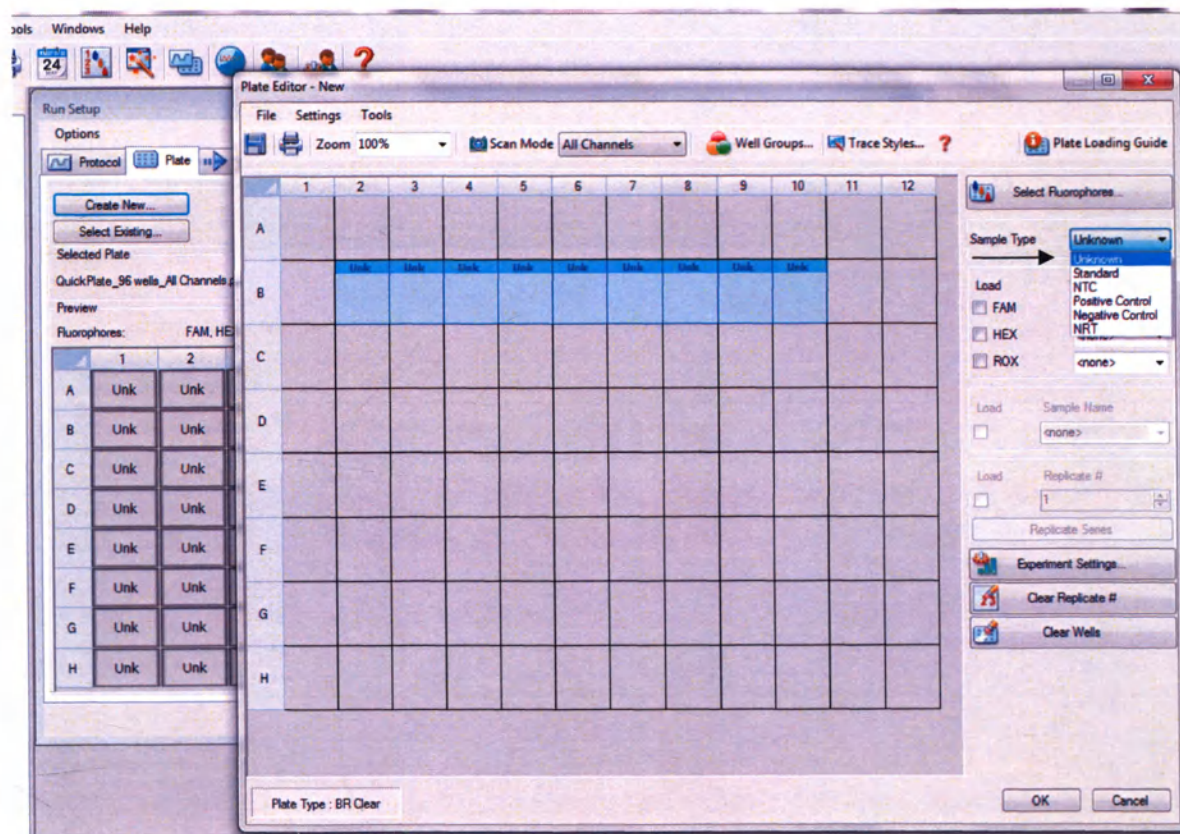
6. Задают условия эксперимента (активно окно «Plate»), используя либо уже готовый шаблон – кнопка «Select Existing», либо создают новый – кнопка «Creative New»



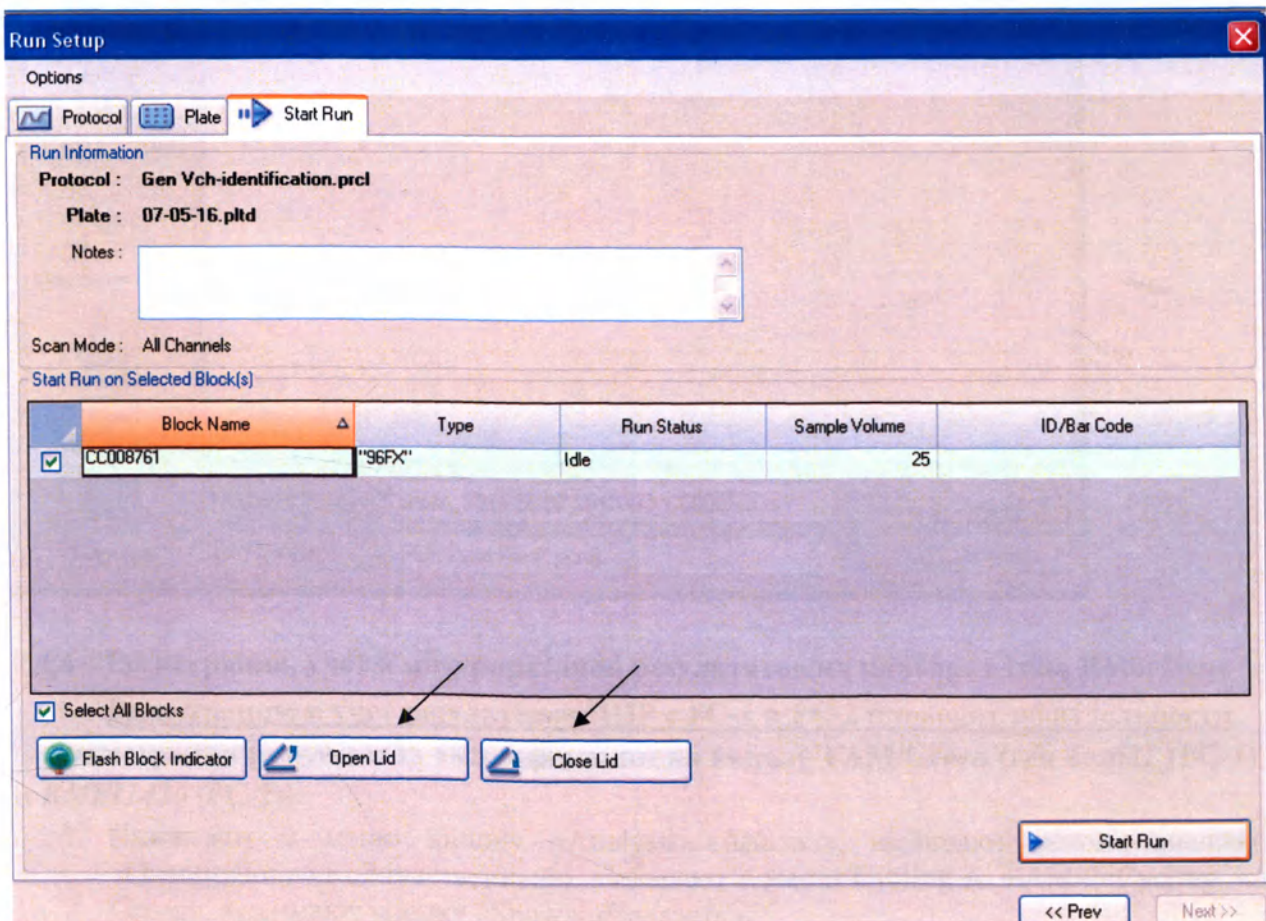
7. В случае создания новой плашки выбирают флуорофоры FAM, HEX, ROX по которым будет проводится регистрация флуоресценции, нажимая кнопку «Select Fluorophores» и отмечая галочкой необходимые каналы

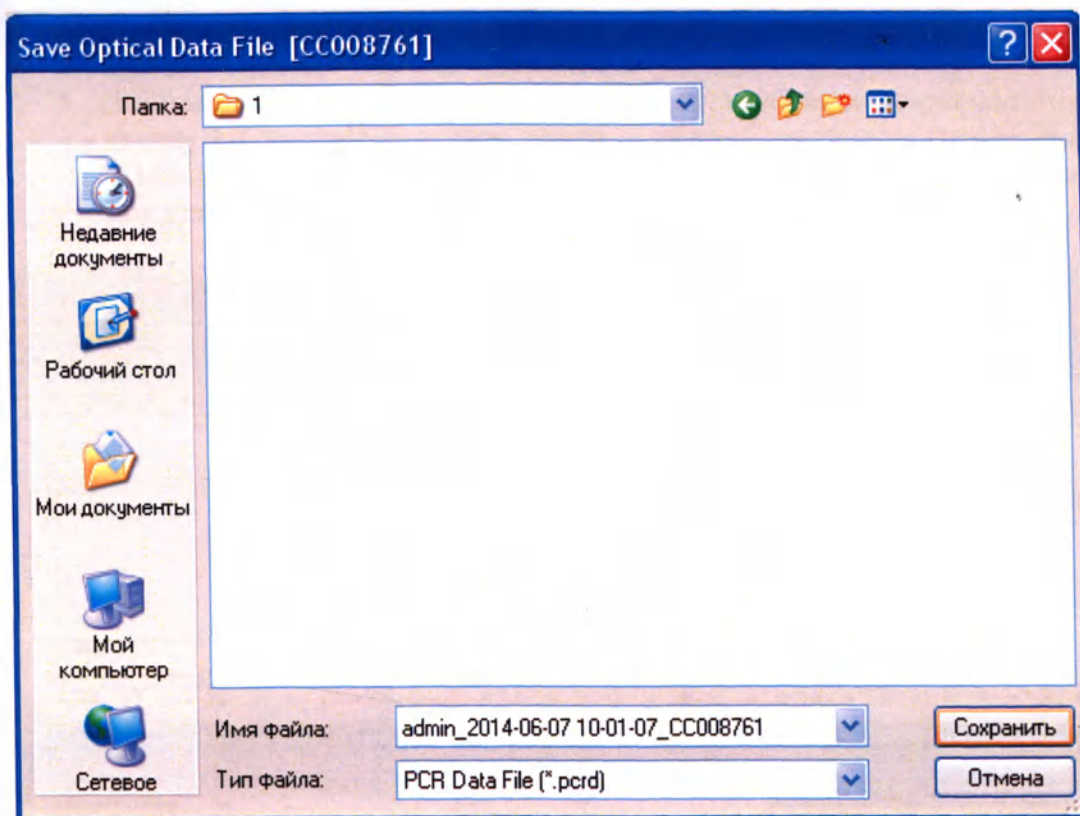


8. Затем с помощью левой кнопки мыши выделяют ячейки в которые установлены пробирки (при выделении ячейки окрашиваются в темно-серый цвет). Указывают тип образцов, для чего нажимают кнопку «Sample Type» и выбирают «Unknown». Нажимают галочки в окнах рядом с обозначенными флуорофорами. Нажимают кнопку «OK» и сохраняют файл с условиями эксперимента.



9. Помещают пробирки в амплификатор (в лунки, которые были обозначены ранее). Для открытия крышки используют кнопку «Open Lid» или нажимают кнопку на крышке прибора, для закрытия крышки используют кнопку «Close Lid» или нажимают кнопку на крышке прибора/ Запускают амплификацию (активно окно «Start Run») нажимаю кнопку «Start Run» и сохраняют в соответствующей папке протокол.



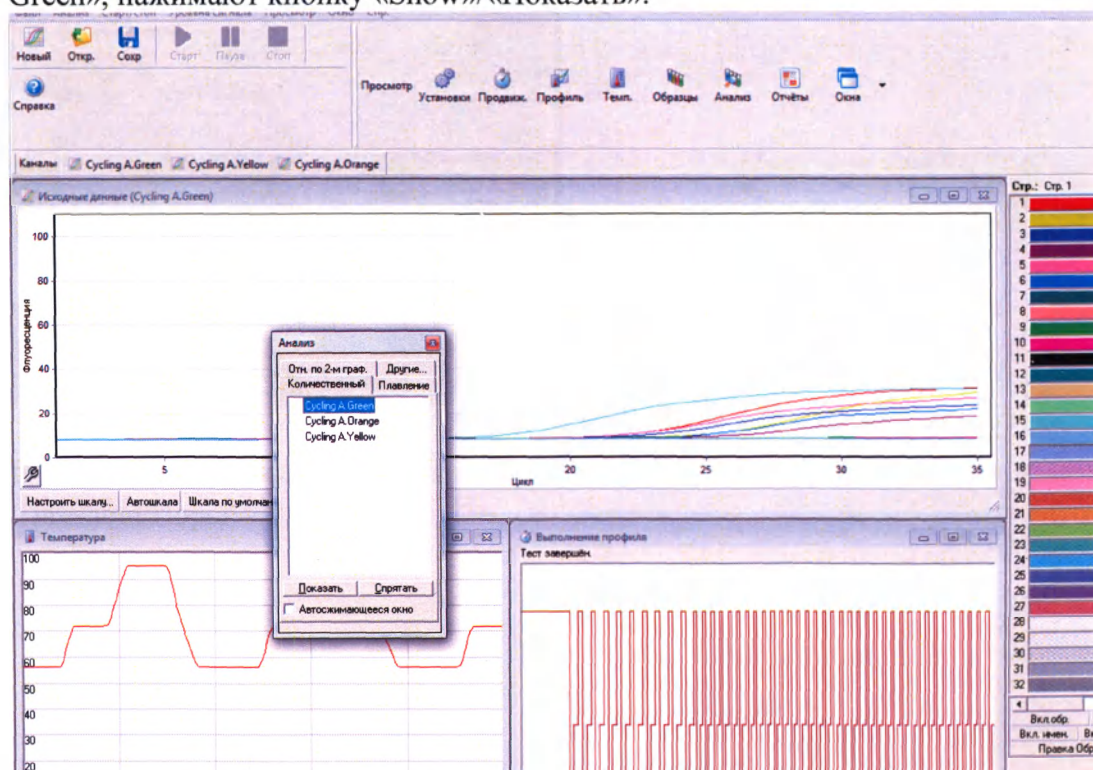


7.4.4 Регистрация, учет и интерпретация результатов на приборах типа RotorGene

Регистрацию и учет результатов ПЦР с РС-1 и РС-2 проводят по отдельности

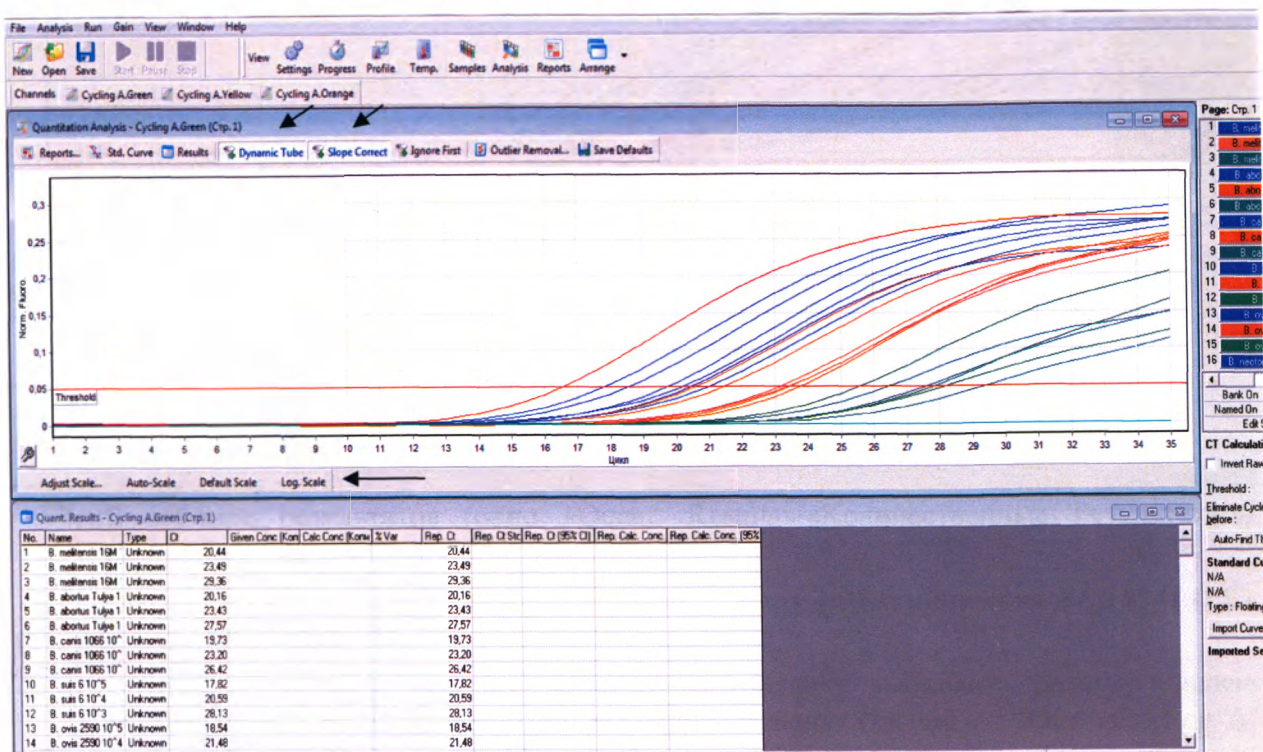
Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green (ген *bcsf31* (РС-1) и *BMEI1426* (РС-2)):

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

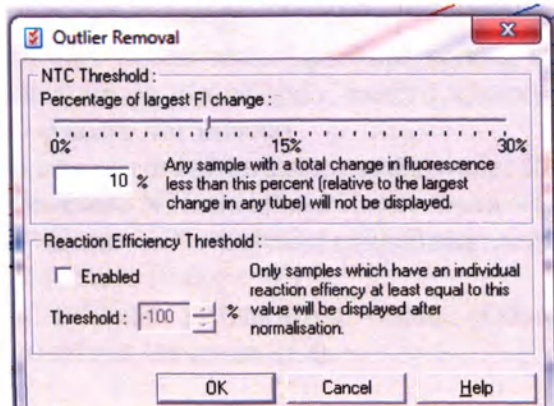


2. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.

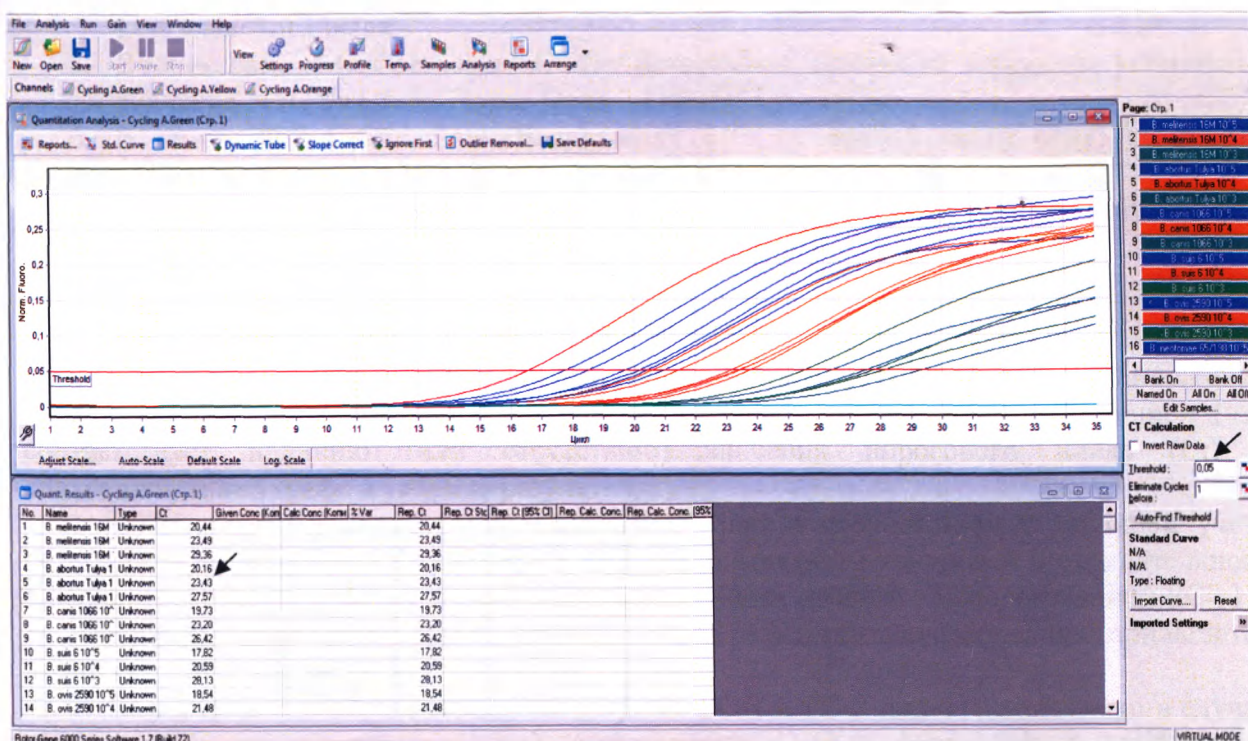
3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).



5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.



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



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

Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (ген *BRA0541* (PC-1) и *BME10711* (PC-2)):

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange (ген *BRA0420* (PC-1) и *BME10994* (PC-2)):

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

Log scale/Лог.шкала).

5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения (Ct).

Учет результатов на приборах типа RotorGene

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).

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительного, отрицательного контролей и отрицательного контроля выделения и таблицей интерпретации данных анализа с использованием PC-1 и PC-2 или с использованием автоматического учета результатов исследования (прилагается на диске).

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

Наименование контроля	Значения порогового цикла (Ct) по каналам					
	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2		
	FAM <i>bcspr31</i>	JOE <i>BRA0541</i>	ROX <i>BRA0420</i>	FAM <i>BMEI1426</i>	JOE <i>BMEI0711</i>	ROX <i>BMEI0994</i>
К +	≤26	≤26	≤26	≤26	≤26	≤26
К-	-	-	-	-	-	-
OKB	-	-	-	-	-	-

Пороговое значение Ct для положительных проб с PC-1 и PC-2 по каналам FAM, JOE, ROX составляет не более 26.

Если по каналу FAM с PC-1 выявлено значение Ct в пределах менее 26 при получении двух или более отрицательных результатов по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 результат анализа считают положительным - выявлена ДНК *Brucella* spp., однако видовая идентификация патогена невозможна, поскольку штамм имеет генетические изменения. Для определения видовой принадлежности требуются дополнительные исследования (с использованием протоколов рекомендованных ВОЗ: Bruce-ladder, Suis-ladder, определения профиля рестрикции *omp25*, *omp2a*, *omp2b* генов, данных полногеномного секвенирования и MLVA-типирования).

Если по каналу FAM с PC-1 выявлено значение Ct в пределах более 26 при любых значениях Ct по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 результат анализа считают положительным - выявлена ДНК *Brucella* spp., однако видовая идентификация патогена невозможна, поскольку в пробе недостаточное количество ДНК бруцелл. Необходимо повторить исследование. Если при повторном исследовании получены значения Ct с PC-1 и PC-2 по каналам FAM, JOE, ROX не более 26 - результат считают положительным и определяют вид патогена.

При повторном получении значений Ct по каналу FAM с PC-1 в пределах более 26 при любых значениях Ct по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 в случае исследования нативных проб осуществляют их исследование после обогащения в жидкой питательной среде или биопробы. Анализ осуществляют с этапа выделения ДНК. При отсутствии повышения значений Ct результат считают отрицательным.

При повторном получении значений Ct по каналу FAM с PC-1 в пределах более 26

Инструкция по применению «БРУ-ДИФ-РГФ» Страница 26 из 44

при любых значениях Ct по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 в случае исследования бактериальных суспензий бруцелл анализ осуществляют еще раз, начиная с этапа выделения ДНК.

Таблица интерпретации результатов с PC-1 и PC-2

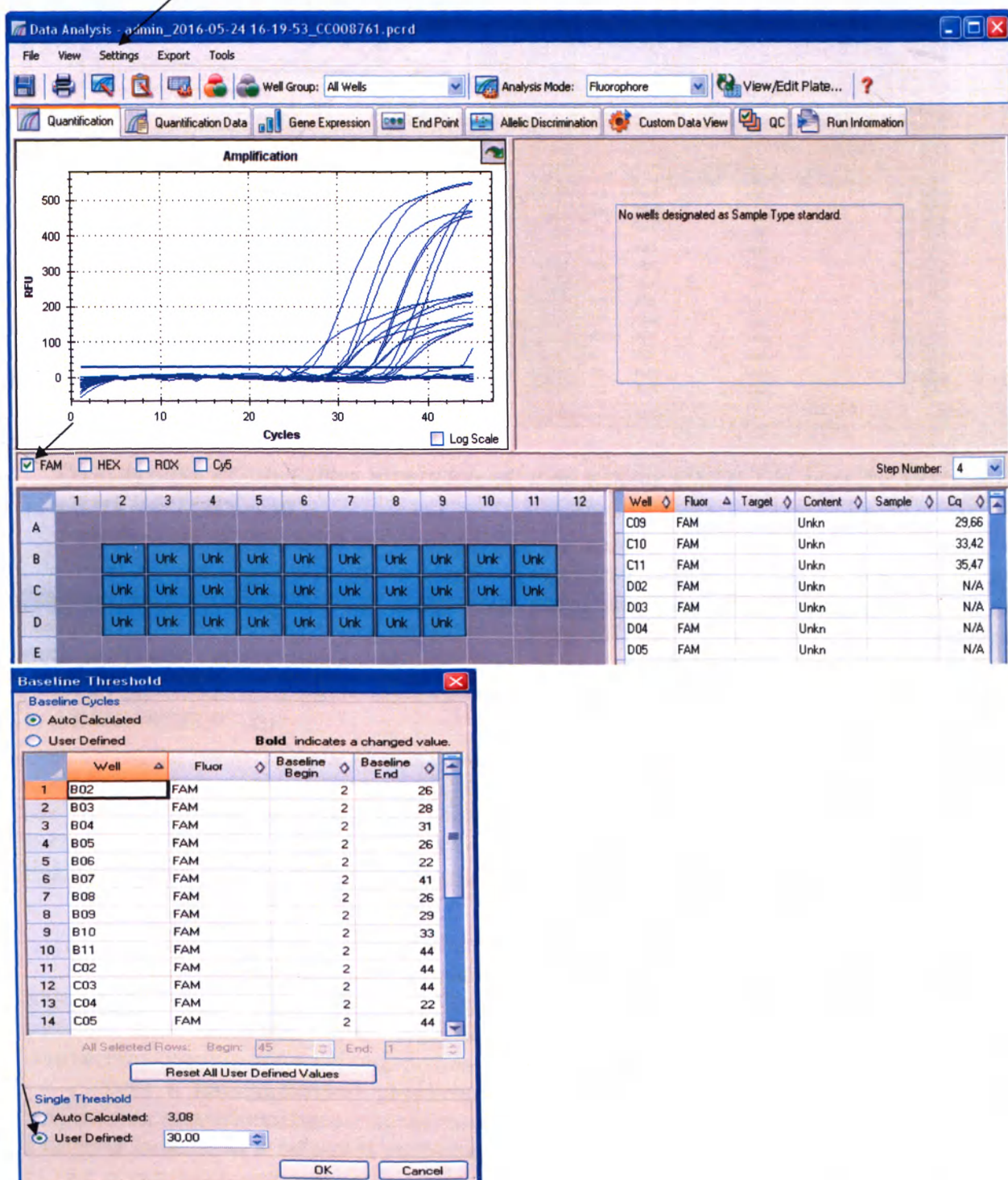
Пробы	Значения порогового цикла (Ct) по каналам						Результат анализа
	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2			
	Green	Yellow	Orange	Green	Yellow	Orange	
	<i>bcsp31</i>	<i>BRA0907</i>	<i>BRA0420</i>	<i>BMEI1426</i>	<i>BMEI0711</i>	<i>BMEI0994</i>	
Исследуемые пробы	≤26	≤26	-	≤26	≤26	≤26	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. abortus</i>
	≤26	-	≤26	≤26	≤26	≤26	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. melitensis</i>
	≤26	≤26	≤26	≤26	≤26	≤26	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. suis</i>
	≤26	≤26	≤26	-	≤26	≤26	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. canis</i>
	≤26	≤26	≤26	≤26	≤26	-	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. ovis</i> .
	≤26	≤26	≤26	≤26	-	≤26	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. neotomae</i>
	-	-	-	-	-	-	Отрицательный/ ДНК <i>Brucella spp.</i> не выявлена
	≤26	При получении двух или более отрицательных результатов по любым каналам					Положительный/ выявлена ДНК <i>Brucella spp.</i> штамм генетически измененный. Для определения видовой принадлежности требуются дополнительные исследования
	> 26	Любое значение					Положительный/ выявлена ДНК <i>Brucella spp.</i> , в количестве недостаточном для видовой идентификации
	≤26	При значение Ct > 26 по одному или нескольким каналам					
	-	Любое значение					Результат невалидный. Требуется подтверждение принадлежности к роду

7.4.5 Регистрация, учет и интерпретация результатов на приборах типа CFX

Регистрацию и учет результатов ПЦР с PC-1 и PC-2 проводят по отдельности

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM (CFX) (ген *bcsf31* (PC-1) и *BME1426* (PC-2)):

1. Оставляем выделенным галочкой только флуорофор «FAM». Для выбора пороговой линии Threshold нажимают кнопку «Setting» в окне с учетом результатов реакции и выбирают функцию «Baseline Threshold». В открывшемся окне выбирают вместо автоматического расчета значений пороговой линии функцию «User Defined» (внизу окна) и выставляют значение 50,0.



3. Выделяя курсором выделенные ячейки, где были установлены пробирки, определяют значения C_t (в правом нижнем углу окна). Кривая флуоресценции и значения C_t для выделенной пробы выделены цветом.



Регистрация результатов амплификации по каналу HEX(CFX) (ген BRA0541 (PC-1) и BME10711 (PC-2)):

1. Оставляют выделенным галочкой только флуорофор «HEX».
2. Для выбора пороговой линии Threshold нажимают кнопку «Setting» в окне с учетом результатов реакции и выбирают функцию «Baseline Threshold». В открывшемся окне выбирают вместо автоматического расчета значений пороговой линии функцию «User Defined» (внизу окна) и выставляют значение 50,0.

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX(CFX) (ген BRA0420 (PC-1) и BME10994 (PC-2)):

1. Оставляют выделенным галочкой только флуорофор «ROX».
2. Для выбора пороговой линии Threshold нажимают кнопку «Setting» в окне с учетом результатов реакции и выбирают функцию «Baseline Threshold». В открывшемся окне выбирают вместо автоматического расчета значений пороговой линии функцию «User Defined» (внизу окна) и выставляют значение 50,0.

Учет результатов на приборах типа CFX

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 (C_t) в соответствующей графе в таблице результатов).

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительного, отрицательного контролей и отрицательного контроля выделения и таблицей интерпретации данных анализа с использованием PC-1 и PC-2 с использованием автоматического учета результатов исследования (прилагается на диске).

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

Наименование контроля	Значения порогового цикла (Ct) по каналам					
	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2		
	FAM <i>bcbp31</i>	HEX <i>BRA0541</i>	ROX <i>BRA0420</i>	FAM <i>BMEI1426</i>	HEX <i>BMEI0711</i>	ROX <i>BMEI0994</i>
K +	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38
K-	-	-	-	-	-	-
OKB	-	-	-	-	-	-

Пороговое значение Ct для положительных проб с PC-1 и PC-2 по каналам FAM, JOE, ROX составляет не более 38.

Если по каналу FAM с PC-1 выявлено значение Ct в пределах менее 38 при получении двух или более отрицательных результатов по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 результат анализа считают положительным - выявлена ДНК *Brucella* spp., однако видовая идентификация патогена невозможна, поскольку штамм имеет генетические изменения. Для определения видовой принадлежности требуются дополнительные исследования (с использованием протоколов рекомендованных ВОЗ: Bruce-ladder, Suis-ladder, определения профиля рестрикции *omp25*, *omp2a*, *omp2b* генов, данных полногеномного секвенирования и MLVA-типирования).

Если по каналу FAM с PC-1 выявлено значение Ct в пределах более 38 при любых значениях Ct по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2, то результат анализа считают положительным - выявлена ДНК *Brucella* spp., однако видовая идентификация патогена невозможна, поскольку в пробе недостаточное количество ДНК бруцелл. Необходимо повторить исследование. Если при повторном исследовании получены значения Ct с PC-1 и PC-2 по каналам FAM, JOE, ROX не более 38 - результат считают положительным и определяют вид патогена.

Если по каналу FAM с PC-1 выявлено значение Ct в пределах менее 38, а по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 выявлено хотя бы одно значение Ct более 38, то результат анализа считают положительным - выявлена ДНК *Brucella* spp., однако видовая идентификация патогена невозможна, поскольку в пробе недостаточное количество ДНК бруцелл. Необходимо повторить исследование. Если при повторном исследовании получены значения Ct с PC-1 и PC-2 по каналам FAM, JOE, ROX не более 38 - результат считают положительным и определяют вид патогена.

При повторном получении значений Ct по каналу FAM с PC-1 в пределах более 38 при любых значениях Ct по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 или когда по каналу FAM с PC-1 выявлено значение Ct в пределах менее 38, а по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 выявлено хотя бы одно значение Ct более 38, в случае исследования нативных проб осуществляют их исследование после обогащения в жидкой питательной среде или биопробы. Анализ осуществляют с этапа выделения ДНК. При отсутствии повышения значений Ct результат считают отрицательным.

При повторном получении значений Ct по каналу FAM с PC-1 в пределах более 38 при любых значениях Ct по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 или когда по каналу FAM с PC-1 выявлено значение Ct в пределах менее 38, а по каналам JOE и ROX с PC-1 и каналам FAM, JOE, ROX с PC-2 выявлено хотя бы одно значение Ct более 38, в случае исследования бактериальных суспензий бруцелл анализ осуществляют еще раз, начиная с этапа выделения ДНК.

Таблица интерпретации результатов с PC-1 и PC-2

Пробы	Значения порогового цикла (Ct) по каналам						Результат анализа
	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2			
	FAM	HEX	ROX	FAM	HEX	ROX	
	<i>bcsp31</i>	<i>BRA0907</i>	<i>BRA0420</i>	<i>BMEI1426</i>	<i>BMEI0711</i>	<i>BMEI0994</i>	
Исследуемые пробы	≤38	≤38	-	≤38	≤38	≤38	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. abortus</i>
	≤38	-	≤38	≤38	≤38	≤38	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. melitensis</i>
	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. suis</i>
	≤38	≤38	≤38	-	≤38	≤38	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. canis</i>
	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	-	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. ovis</i> .
	≤38	≤38	≤38	≤38	-	≤38	Положительный/ выявлена ДНК <i>B. neotomae</i>
	-	-	-	-	-	-	Отрицательный/ ДНК <i>Brucella</i> spp. не выявлена
	≤38	При получении двух или более отрицательных результатов по любым каналам					Положительный/ выявлена ДНК <i>Brucella</i> spp. штамм генетически измененный. Для определения видовой принадлежности требуются дополнительные исследования
	> 38	Любое значение					Положительный/ выявлена ДНК <i>Brucella</i> spp., в количестве недостаточном для видовой идентификации
	≤38	При значение Ct > 38 по одному или нескольким каналам					
	-	Любое значение					Результат невалидный. Требуется подтверждение принадлежности к роду <i>Brucella</i> .

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Транспортирование набора реагентов «Бру-Диф-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 – неограниченно.

Условия хранения компонентов набора реагентов «Бру-Диф-РГФ» – ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-2, ПЦР-смесь-РГФ, Растворитель, ТЕ-буфер, ПКО ДНК *Brucella* spp. при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С, Таq ДНК-полимераза - при температуре от минус 16 до минус 20 °С.

Срок годности набора реагентов «Бру-Диф-РГФ» - 6 месяцев.

Срок годности ПКО ДНК *Brucella* spp. после растворения – 6 месяцев при хранении при температуре от минус 16 до минус 20 °С.

Условия эксплуатации набора реагентов «Бру-Диф-РГФ» – при температуре от 18 до 25 °С.

9. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Бру-Диф-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» Роспотребнадзора

А.К.Никифоров



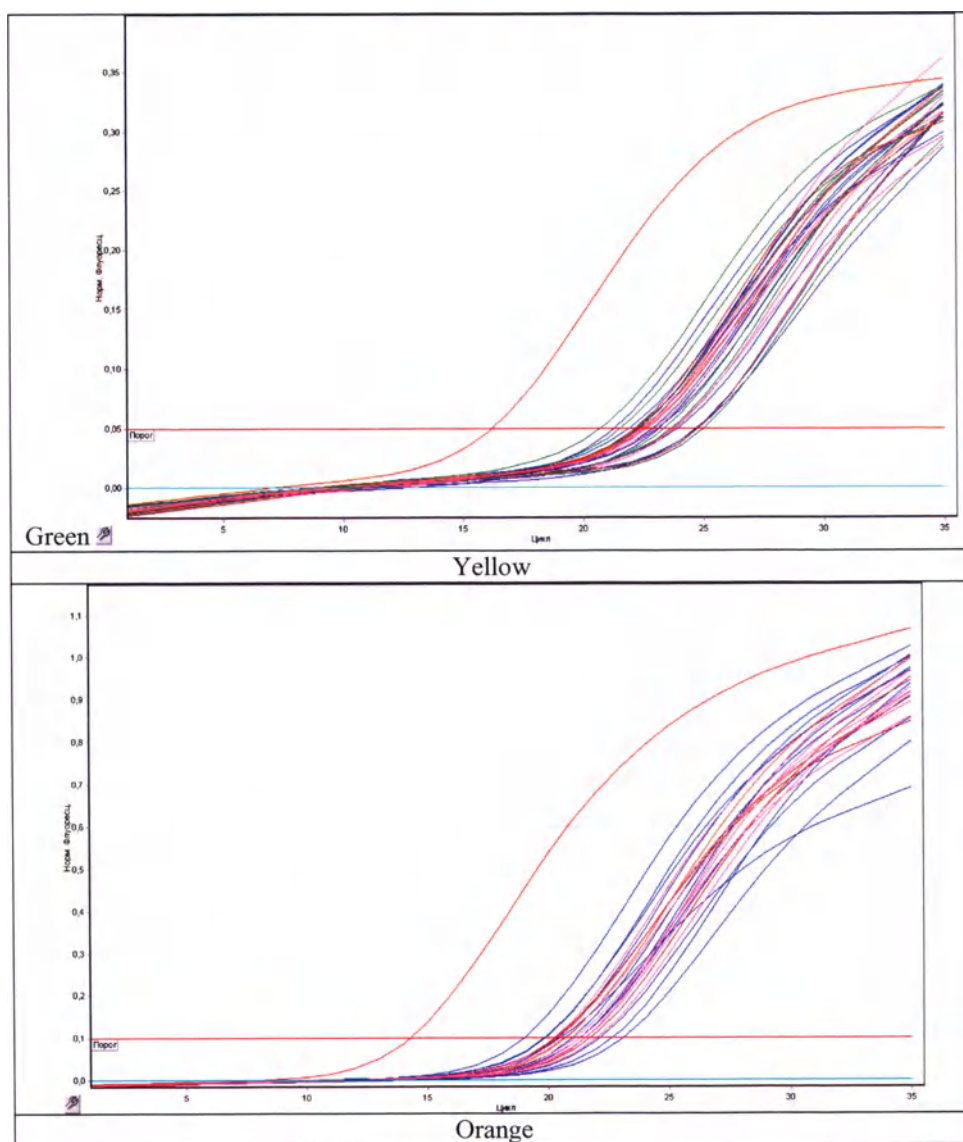
Согласовано

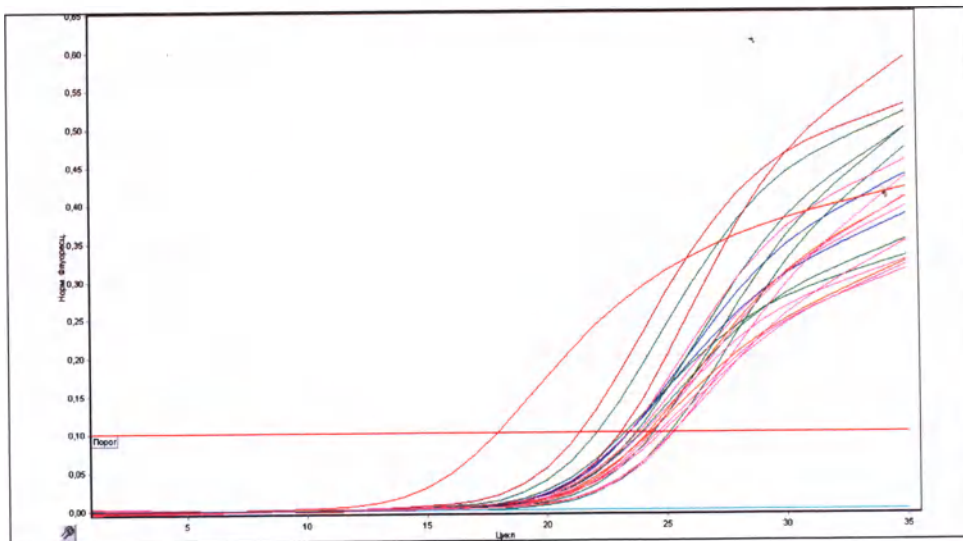
Генеральный директор ООО «ВЫМЦЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Пример регистрации, учета и интерпретации результатов с использованием набора реагентов «БРУ-ДИФ-РГФ» на приборе типа Rotor-Gene

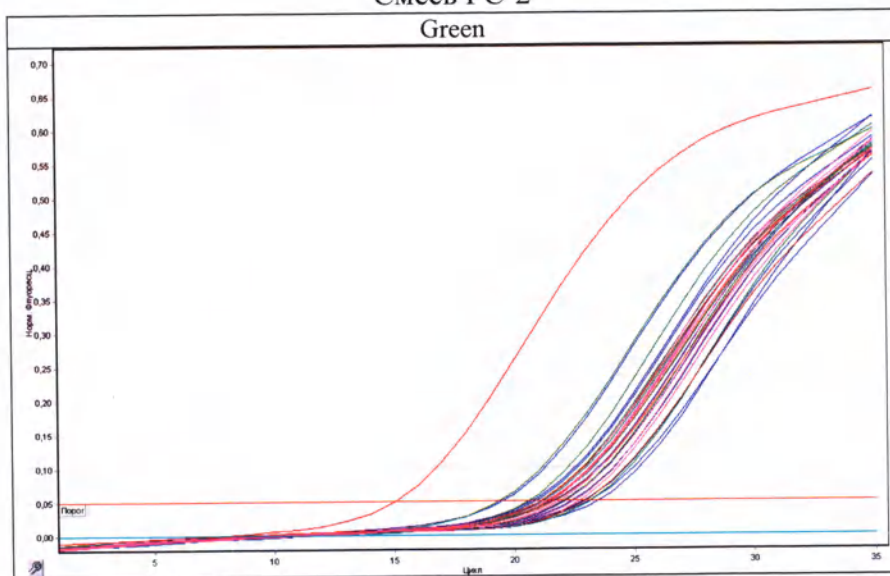
Смесь РС-1



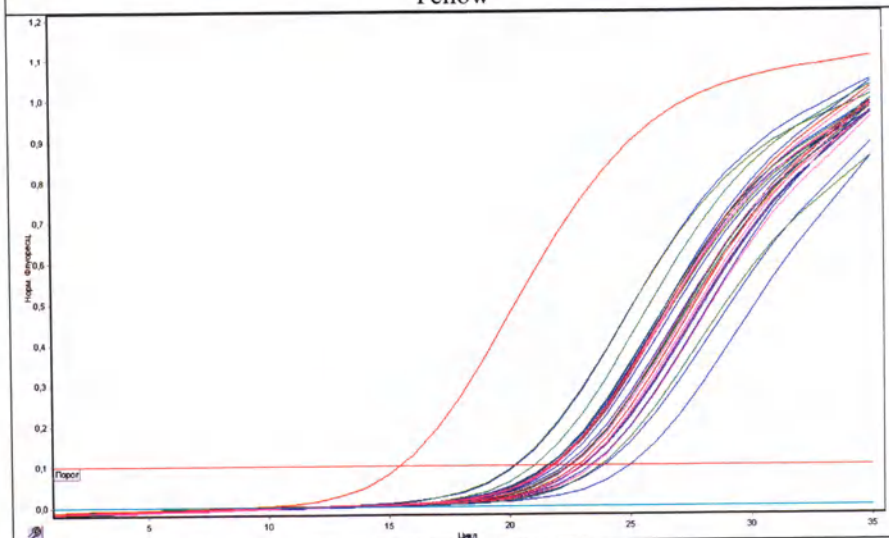


Смесь РС-2

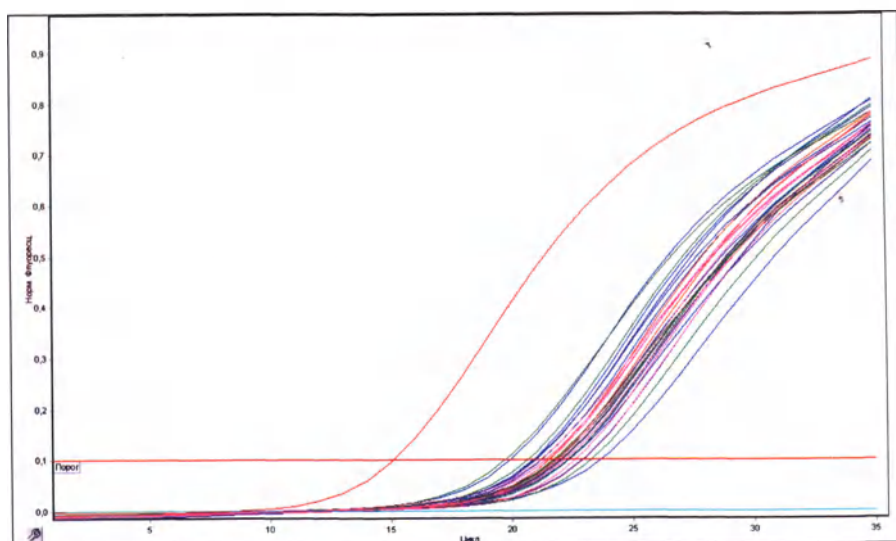
Green



Yellow

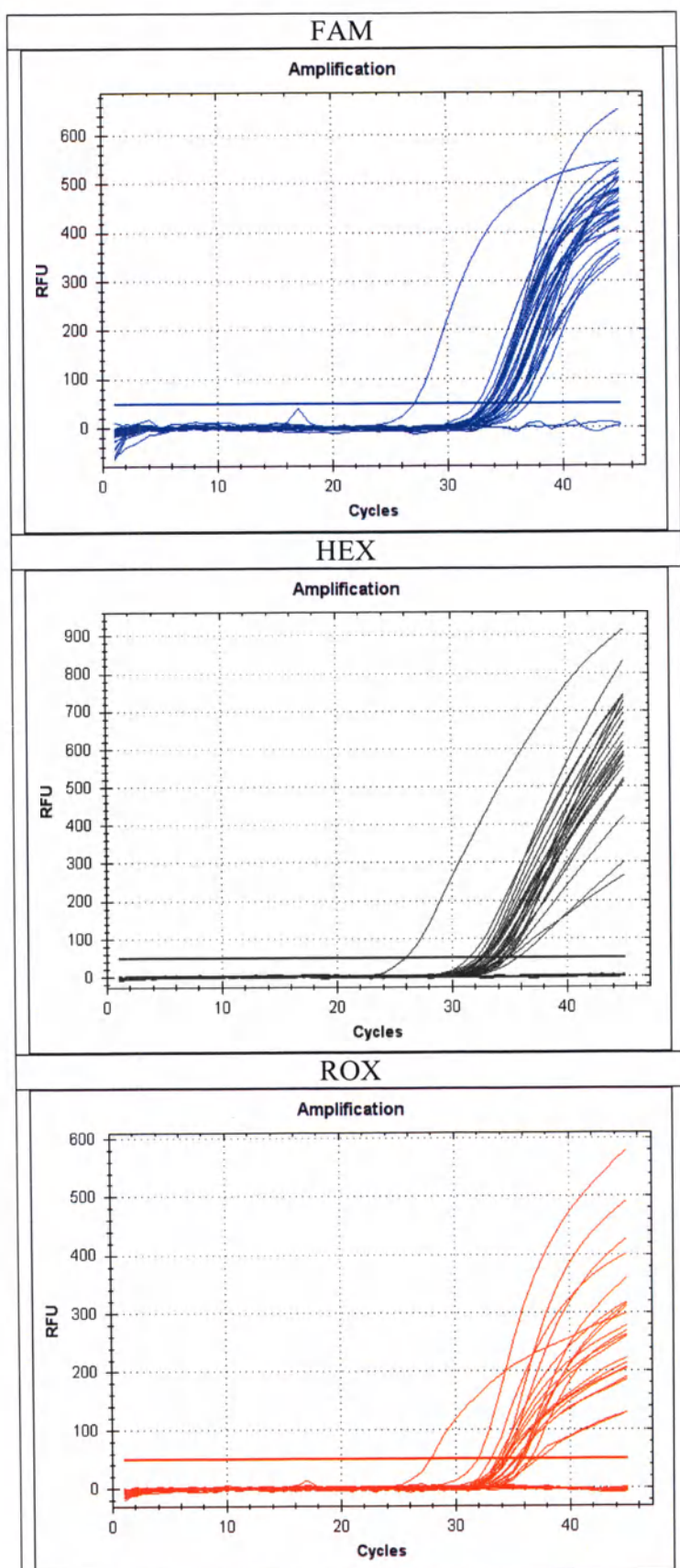


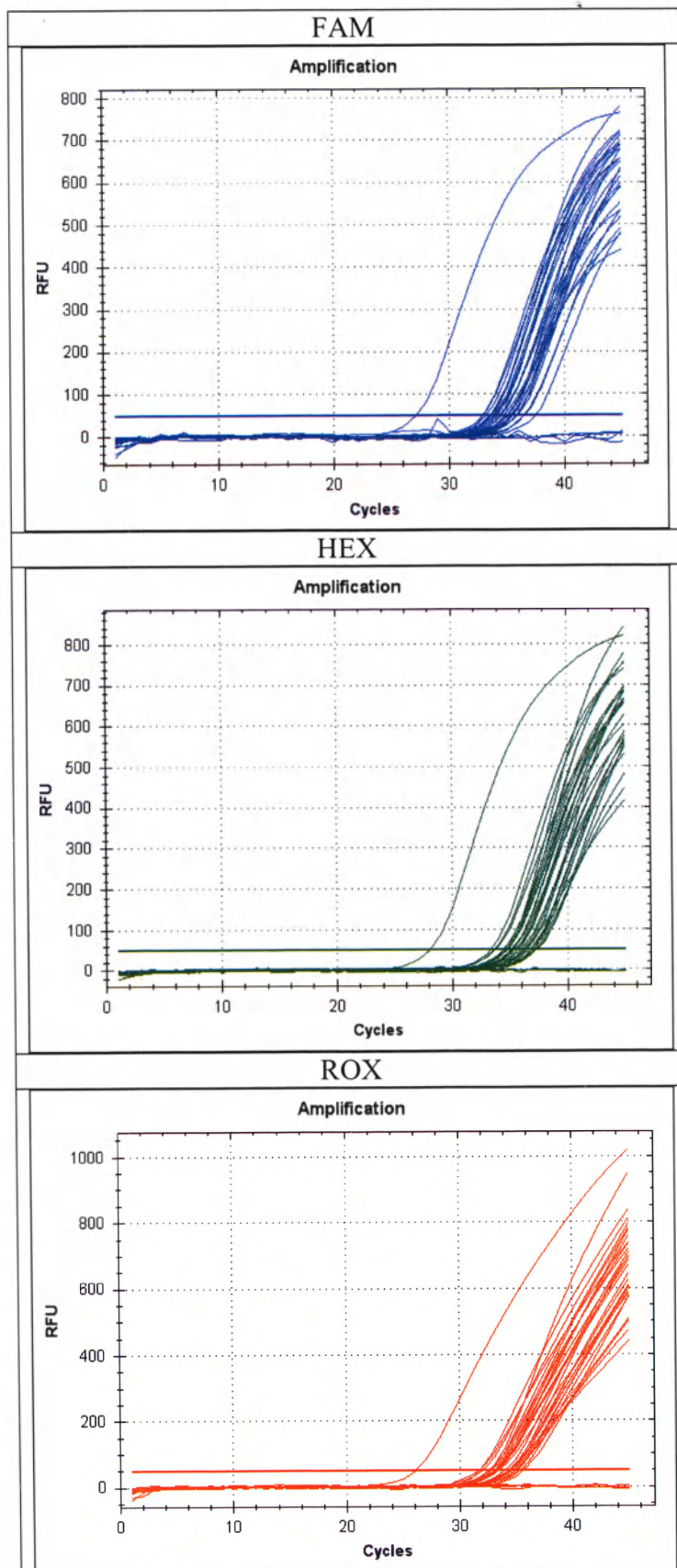
Orange



Имя пробы	PC-1			PC-2			Результат анализа
	FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	
	bcs31	BRA0907	BRA0420	BME11426	BME110711	BME10994	
B. abortus 1271	22,54	20,49		20,73	21,6	20,99	Brucella abortus
B. abortus 164-70	24,77	23,08		22,89	25,01	23,68	Brucella abortus
B. abortus 19BA	21,3	19		19,49	20,28	19,92	Brucella abortus
B. abortus 3196	23,14	21		21,64	22,31	21,72	Brucella abortus
B. abortus 63/75	23,93	22,63		23,11	23,91	22,37	Brucella abortus
B. abortus 870	23,11	21,31		22,41	23,03	22,32	Brucella abortus
B. abortus A-81	22,9	21,32		22,07	23,07	22,06	Brucella abortus
B. abortus C-442	24,69	22,13		23,46	23,38	22,9	Brucella abortus
B. abortus Tulya	22,29	19,87		20,86	22,03	20,92	Brucella abortus
B. canis 1066	21,91	19,82	23,4		21,64	20,86	Brucella canis
B. canis 6/66	22,33	20,41	23,43		21,65	21,22	Brucella canis
B. melitensis 16M	23,38		24,42	21,49	22,47	22,03	Brucella melitensis
B. melitensis 570	21,56		23,22	20,58	21,04	20,65	Brucella melitensis
B. melitensis 63/9	23,67		25,1	22,09	22,54	22,33	Brucella melitensis
B. melitensis 706	25		25,51	23,16	23,79	23,25	Brucella melitensis
B. melitensis C-563	20,72		22,05	19,37	20,2	19,72	Brucella melitensis
B. melitensis C-565	22,27		23,89	21,16	21,61	21,72	Brucella melitensis
B. melitensis C-568	22,2		23,69	21,18	21,82	21,84	Brucella melitensis
B. neotomae 5K33	22,58	20,71	24,2	21,73		21,78	Brucella neotomae
B. neotomae 65/198	22,37	20,35	24,3	21,51		21,52	Brucella neotomae
B. ovis 2590	24,79	21,72	23,07	22,96	22,82		Brucella ovis
B. ovis 440	22,18	20,28	21,36	21,08	21,76		Brucella ovis
B. suis 1330	22,56	22	23,42	21,42	21,78	21,19	Brucella suis
B. suis 31	22,67	21,32	24,35	21,35	22,58	21,98	Brucella suis
B. suis 40	23,72	21,53	25,24	22,54	23,48	22,93	Brucella suis
B. suis 513	22,44	20,38	23,99	21,13	21,89	21,4	Brucella suis
B. suis 6	22,54	20,65	24,61	21,86	22,48	21,9	Brucella suis
B. suis 686	23,82	21,54	25,27	22,71	23,01	22,61	Brucella suis
B. suis C-445	22,98	21,1	24,79	22,15	23,07	22,19	Brucella suis
B. suis Thomsen	22,27	20,25	23,77	21,54	21,84	21,56	Brucella suis
OKB							В пробе ДНК бруцелл не обнаружена
K+	16,2	14,27	17,93	15,03	15,49	15,08	Положительный контрольный образец
K-							В пробе ДНК бруцелл не обнаружена

Пример регистрации, учета и интерпретации результатов с использованием набора реагентов «БРУ-ДИФ-РГФ» на приборе типа CFX96





Имя пробы	Смесь PC-1			Смесь PC-2			Результат анализа
	FAM bcspr31	HEX BRA0907	ROX BRA0420	FAM BMEI1426	HEX BMEI10711	ROX BMEI0994	
B. abortus 1271	33,65	32,45	N/A	33,76	34,72	33,28	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus 164-70	36,3	34,9	N/A	37,47	37,24	35,36	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus 198A	32,56	31,48	N/A	32,99	33,72	31,74	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus 3196	35,06	33,83	N/A	35,03	36,29	34,31	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus 63/75	35,47	34,61	N/A	35,53	36,65	34,67	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus 870	34,73	33,57	N/A	35,31	36,14	34,39	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus A-81	34,96	33,73	N/A	35,1	35,71	34,43	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus C-442	36,3	34,42	N/A	36,49	36,95	35,16	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. abortus Tulya	33,59	32,56	N/A	33,62	34,59	32,6	Выявлена ДНК Brucella abortus
B. canis 1066	33,36	32,16	33,67	N/A	35,12	33,17	Выявлена ДНК Brucella canis
B. canis 6/66	34,09	32,81	34,32	N/A	34,65	32,58	Выявлена ДНК Brucella canis
B. melitensis 16M	34,96	36,77	35,97	35,08	35,93	34,49	Выявлена ДНК Brucella suis
B. melitensis 570	33,44	N/A	33,92	33,2	33,61	32,06	Выявлена ДНК Brucella melitensis
B. melitensis 63/9	35,76	N/A	35,61	35,95	36,34	34,02	Выявлена ДНК Brucella melitensis
B. melitensis 706	37,07	N/A	36,54	35,1	36,39	35,62	Выявлена ДНК Brucella melitensis
B. melitensis C-563	33,11	N/A	33,08	32,95	33,3	31,74	Выявлена ДНК Brucella melitensis
B. melitensis C-565	33,4	N/A	33,98	33,53	34,59	33,18	Выявлена ДНК Brucella melitensis
B. melitensis C-568	34,23	N/A	34,36	33,92	34,77	33,11	Выявлена ДНК Brucella melitensis
B. neotomae 5K33	34,53	33,33	35,23	34,75	N/A	34,66	Выявлена ДНК Brucella neotomae
B. neotomae 65/198	33,43	32,82	34,58	34,4	N/A	33,29	Выявлена ДНК Brucella neotomae
B. ovis 2590	35,81	35,03	34,23	36,48	36,96	N/A	Выявлена ДНК Brucella ovis
B. ovis 440	33,44	32,67	32	33,56	34,45	N/A	Выявлена ДНК Brucella ovis
B. suis 1330	33,41	34,27	34,18	33,54	34,39	32,7	Выявлена ДНК Brucella suis
B. suis 31	34,57	33,61	35,43	34,18	35,6	33,33	Выявлена ДНК Brucella suis
B. suis 40	35,87	34,28	35,77	35,88	37,01	34,92	Выявлена ДНК Brucella suis
B. suis 513	33,68	32,72	34,6	34,38	35,24	33,46	Выявлена ДНК Brucella suis
B. suis 6	35,06	34,8	37,26	35,81	37,3	34,44	Выявлена ДНК Brucella suis
B. suis 686	35,82	35,75	36,85	35,43	37,14	34,97	Выявлена ДНК Brucella suis
B. suis C-445	34,67	33,95	35,35	34,49	35,41	34,35	Выявлена ДНК Brucella suis
B. suis Thomsen	34,16	33,09	34,62	34,05	35,09	32,85	Выявлена ДНК Brucella suis
OKB	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	В пробе ДНК Brucella spp. не обнаружена
K+	27,1	26,01	27,82	27,11	28,06	26,13	Положительный контрольный образец
K-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	В пробе ДНК Brucella spp. не обнаружена

Пример учёта и интерпретации результатов с использованием электронной таблицы Excel

Протокол БРУ-ДИФ-РГФ Rotor-Gene - Microsoft Excel							
Главная Вставка Разметка страницы Формулы Данные Рецензирование Вид ABSY FineReader 11							
Буфер обмена Шрифт Выравнивание Число							
N17							
A B C D E F G H I							
1 Если запуск макросов отключён, сверху ↑ появится соответствующее предупреждение. Включите это содержимое.							
2 Введите имя пробы (не обязательно) и значения Ct по всем каналам. Можно использовать комбинации: Ctrl + C (+ V)							
3 Протокол "БРУ-ДИФ-РГФ" Rotor-Gene							
№	Имя пробы	Смесь PC-1			Смесь PC-2		Результаты проведения ПЦР на приборе Rotor-Gene 28 июня 2018 г. 14:23
		Green (FAM) bcspr31	Yellow (JOE) BRA0907	Orange (ROX) BRA0420	Green (FAM) BMEI1426	Yellow (JOE) BMEI10711	
1	Проба 1	25,91	24,02		27,2		Выявлена ДНК Brucella spp. в количестве недостаточном для видовой идентификации
2	Проба 2	25,25	22,07	25,16		24,3	25,49 Выявлена ДНК Brucella canis
3	Проба 3	26,46	27,7	26,67	24,59		24,87 Выявлена ДНК Brucella spp. в количестве недостаточном для видовой идентификации
4	Проба 4	24,86	21,66	24,39	22,38		25,51 Выявлена ДНК Brucella neotomae
5	Проба 5		24,43	25,16	24,3	24,6	24,5 Результат невалидный. Требуется подтверждение принадлежности к роду Brucella
6	Проба 6	24,13	20,3	23,57	21,21	22,72	23,13 Выявлена ДНК Brucella suis
7	Проба 7	24,8		24,7		23,71	23,18 Выявлена ДНК Brucella spp., штамм генетически измененный. Требуется дополнительные исследования
8	Проба 8						В пробе ДНК Brucella spp. не обнаружена
9	K+	17,24	14,42	17,25	15,15	15,65	15,57 Положительный контрольный образец
10	K-						В пробе ДНК Brucella spp. не обнаружена
11							

Инструкция по автоматическому учёту результатов применения МИ для диагностики in vitro «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции с учётом результатов в режиме реального времени «Бру-Диф-РГФ» на базе электронной таблицы EXCEL.

Компакт-диск является приложением к инструкции по применению набора реагентов «Бру-Диф-РГФ». На нём, помимо инструкции по автоматическому учёту результатов применения набора реагентов «Бру-Диф-РГФ», имеются два файла-протокола EXCEL:

- «Протокол Бру-Диф-РГФ Rotor-Gene.xlsm» - для учёта результатов, полученных на приборе Rotor-Gene;
- «Протокол Бру-Диф-РГФ CFX96.xlsm» - для учёта результатов, полученных на приборе CFX96

Выберите необходимый Вам файл-протокол и откройте его.

Перед Вами появится электронная таблица EXCEL. Заполните соответствующие графы в таблице: введите имена проб (не обязательно) и значения Ct по всем шести каналам. Для ускорения процесса заполнения можно использовать комбинации клавиш Ctrl + C (копировать) и Ctrl + V (вставить).

Протокол БРУ-ДИФ-РГФ Rotor-Gene - Microsoft Excel

Главная Вставка Разметка страницы Формулы Данные Рецензирование Вид ABBYY FineReader 11

Вставить Буфер обмена Шрифт Выравнивание Число

Общий Условное форматирование Форматировать как таблицу Стили Ячейки

Вставить Удалить Формат Сортировка Найти и выделить

Предупреждение системы безопасности Запуск макросов отключен. Параметры...

B7

1- Если запуск макросов отключён, сверху ↑ появится соответствующее предупреждение. Включите это содержимое.

2 Введите имя пробы (не обязательно) и значения Ct по всем каналам. Можно использовать комбинации: Ctrl + C (+ V)

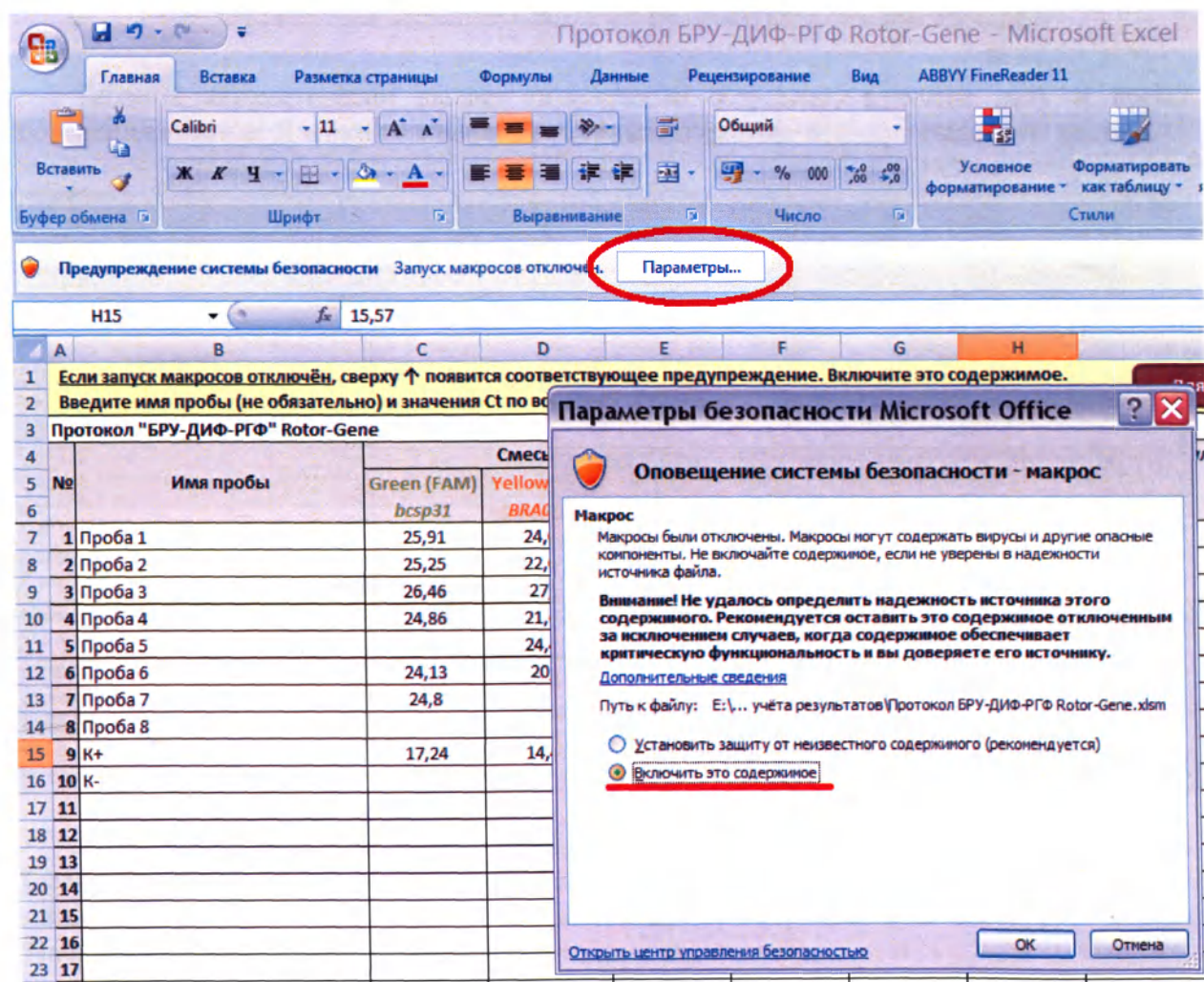
3 Протокол "БРУ-ДИФ-РГФ" Rotor-Gene

№	Имя пробы	Смесь PC-1			Смесь PC-2			Результаты проведения ПЦР на приборе Rotor-Gene
		Green (FAM) bcrp31	Yellow (JOE) BRA0907	Orange (ROX) BRA0420	Green (FAM) BME11426	Yellow (JOE) BME10711	Orange (ROX) BME10994	
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								
32								
33								
34								
35								

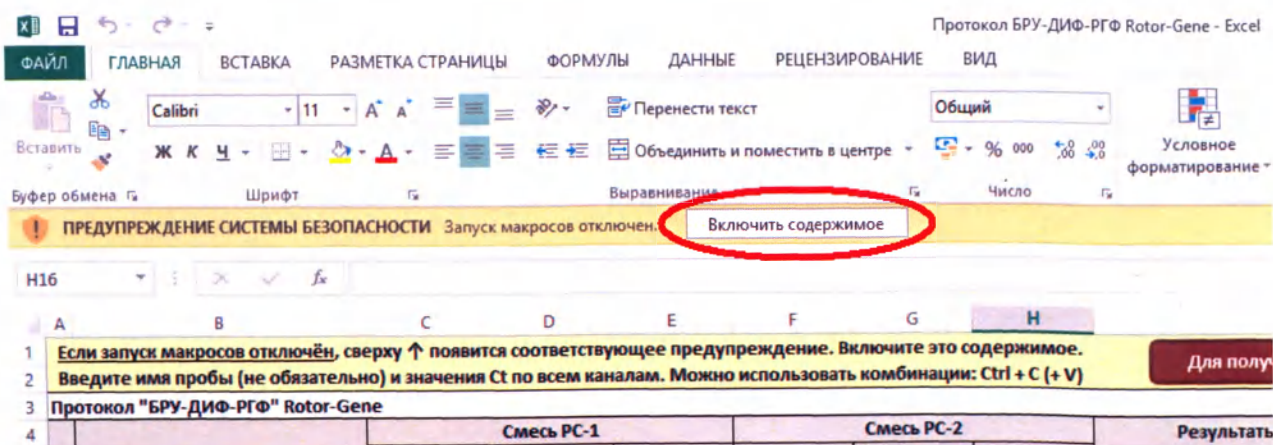
R6 protocol BRUCELLA

Готово

Перед анализом полученных данных необходимо разрешить выполнение программы учёта результатов. Для этого в Microsoft Office 2007 нажмите на кнопку «Параметры». В появившемся окне выберите «Включить это содержимое».



В Microsoft Office 2013 достаточно нажать на кнопку «Включить содержимое»



После ввода данных нажмите на красную кнопку в правом верхнем углу таблицы с соответствующей надписью: «Для получения результата нажмите на эту кнопку!».

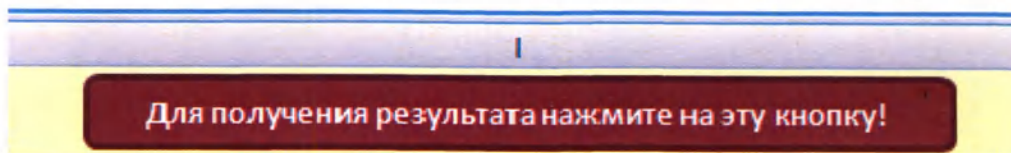


Таблица автоматически выдаст полученный результат, а также дату и время проведения анализа. Ячейки со значением Ct выше порогового, будут выделены цветом.

Протокол БРУ-ДИФ-РГФ Rotor-Gene - Microsoft Excel

Главная Вставка Разметка страницы Формулы Данные Рецензирование Вид ABBYY FineReader 11

Буфер обмена Шрифт Выравнивание Число

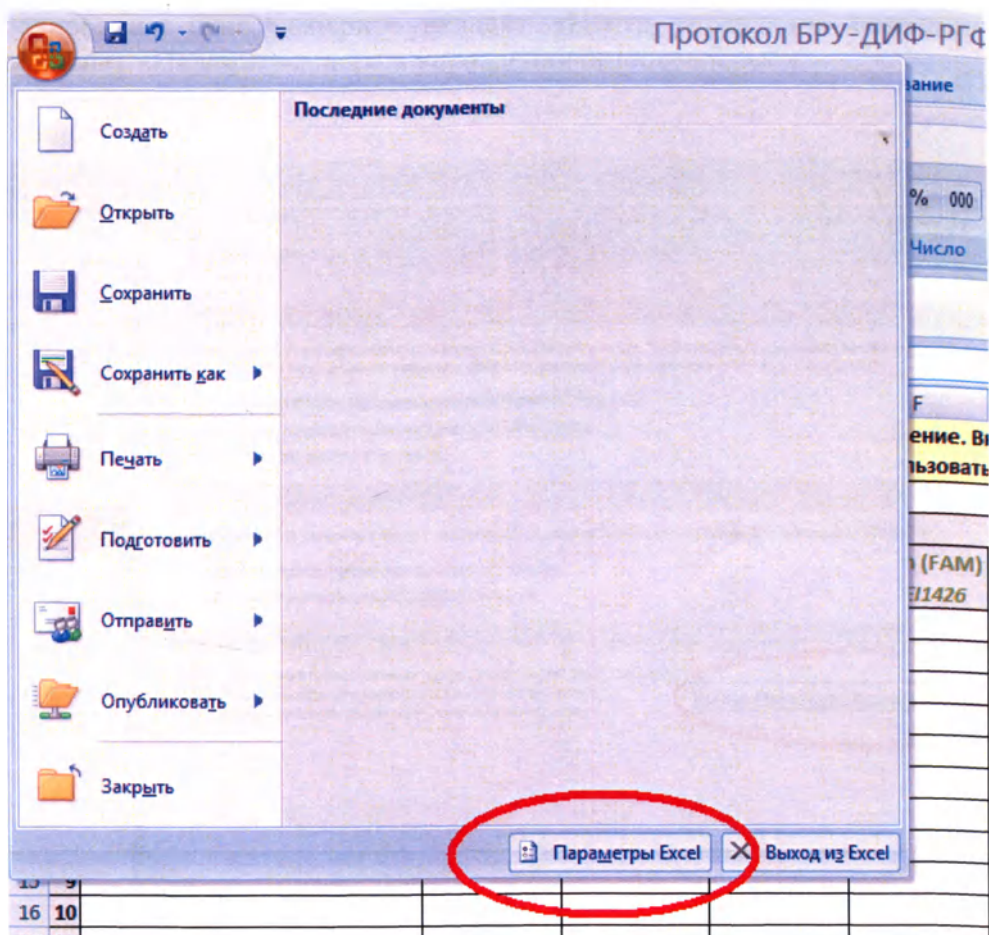
Общий Условное форматирование Форматировать как таблицу Стили Ячейки Вставить Удалить Формат Сортировка Найти и выделить

1 Если запуск макросов отключён, сверху ↑ появится соответствующее предупреждение. Включите это содержимое.
2 Введите имя пробы (не обязательно) и значения Ct по всем каналам. Можно использовать комбинации: Ctrl + C (+ V) Для получения результата нажмите на эту кнопку!

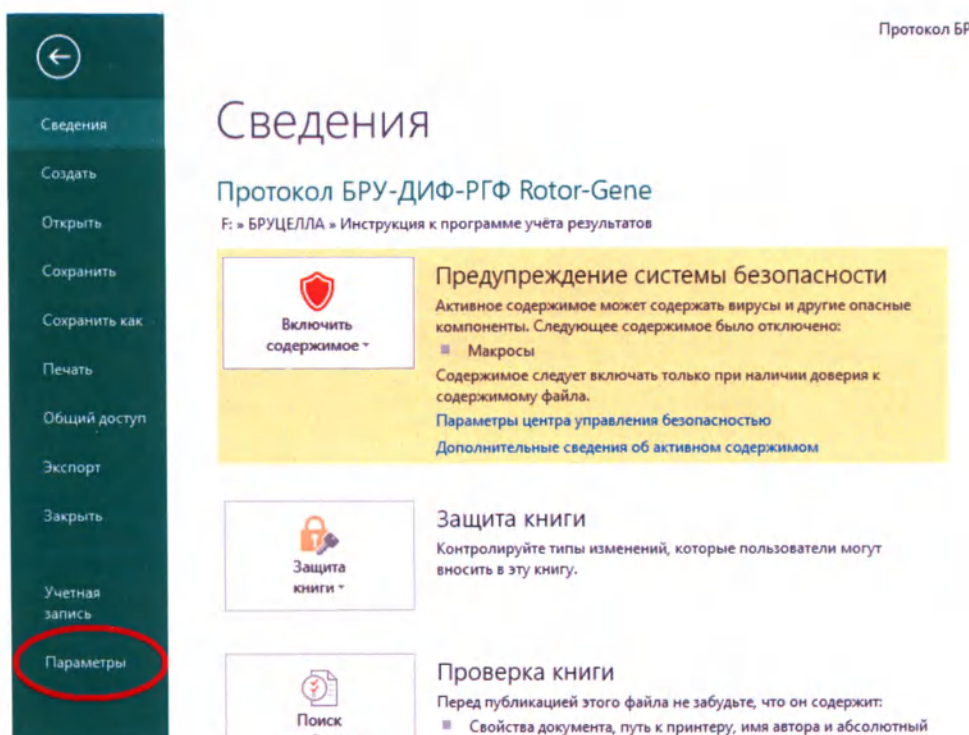
3 Протокол "БРУ-ДИФ-РГФ" Rotor-Gene

№	Имя пробы	Смесь PC-1			Смесь PC-2			Результаты проведения ПЦР на приборе Rotor-Gene 28 июня 2018 г. 14:23
		Green (FAM) bcsp31	Yellow (JOE) BRA0907	Orange (ROX) BRA0420	Green (FAM) BME11426	Yellow (JOE) BME10711	Orange (ROX) BME10994	
1	Проба 1	25,91	24,02		27,2			Выявлена ДНК Brucella spp. в количестве недостаточном для видовой идентификации
2	Проба 2	25,25	22,07	25,16		24,3	25,49	Выявлена ДНК Brucella canis
3	Проба 3	26,46	27,7	26,67	24,59		24,87	Выявлена ДНК Brucella spp. в количестве недостаточном для видовой идентификации
4	Проба 4	24,86	21,66	24,39	22,38		25,51	Выявлена ДНК Brucella neotomae
5	Проба 5		24,43	25,16	24,3	24,6	24,5	Результат невалидный. Требуется подтверждение принадлежности к роду Brucella
6	Проба 6	24,13	20,3	23,57	21,21	22,72	23,13	Выявлена ДНК Brucella suis
7	Проба 7	24,8		24,7		23,71	23,18	Выявлена ДНК Brucella spp., штамм генетически измененный. Требуется дополнительные исследования
8	Проба 8							В пробе ДНК Brucella spp. не обнаружена
9	К+	17,24	14,42	17,25	15,15	15,65	15,57	Положительный контрольный образец
10	К-							В пробе ДНК Brucella spp. не обнаружена
11								

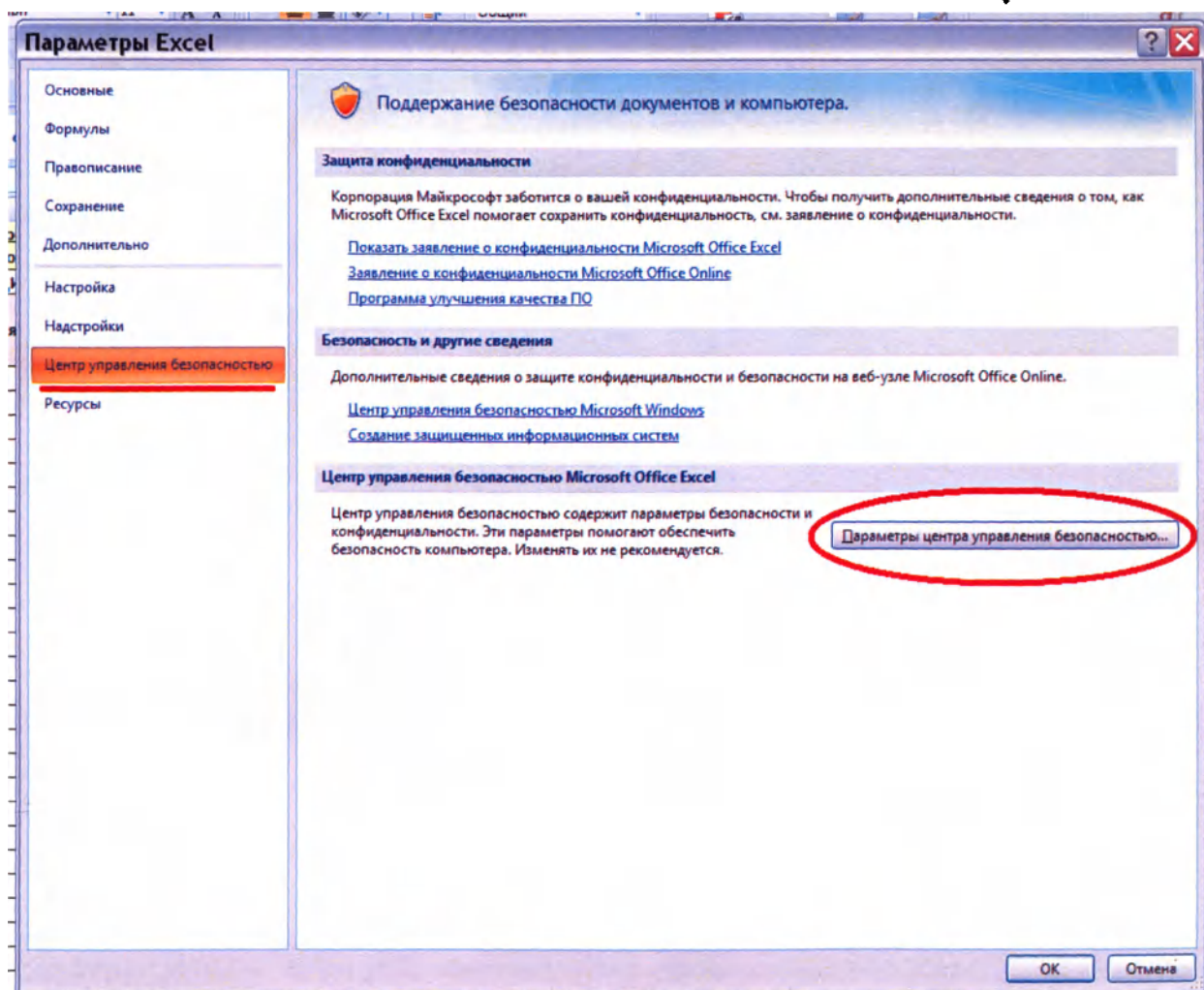
Полезный совет. Проверку системы безопасности макросов можно отключить. После этого не придётся для каждого анализа повторно включать содержимое. Для этого войдите в меню списка возможных действий с документом и выберите кнопку «Параметры Excel».



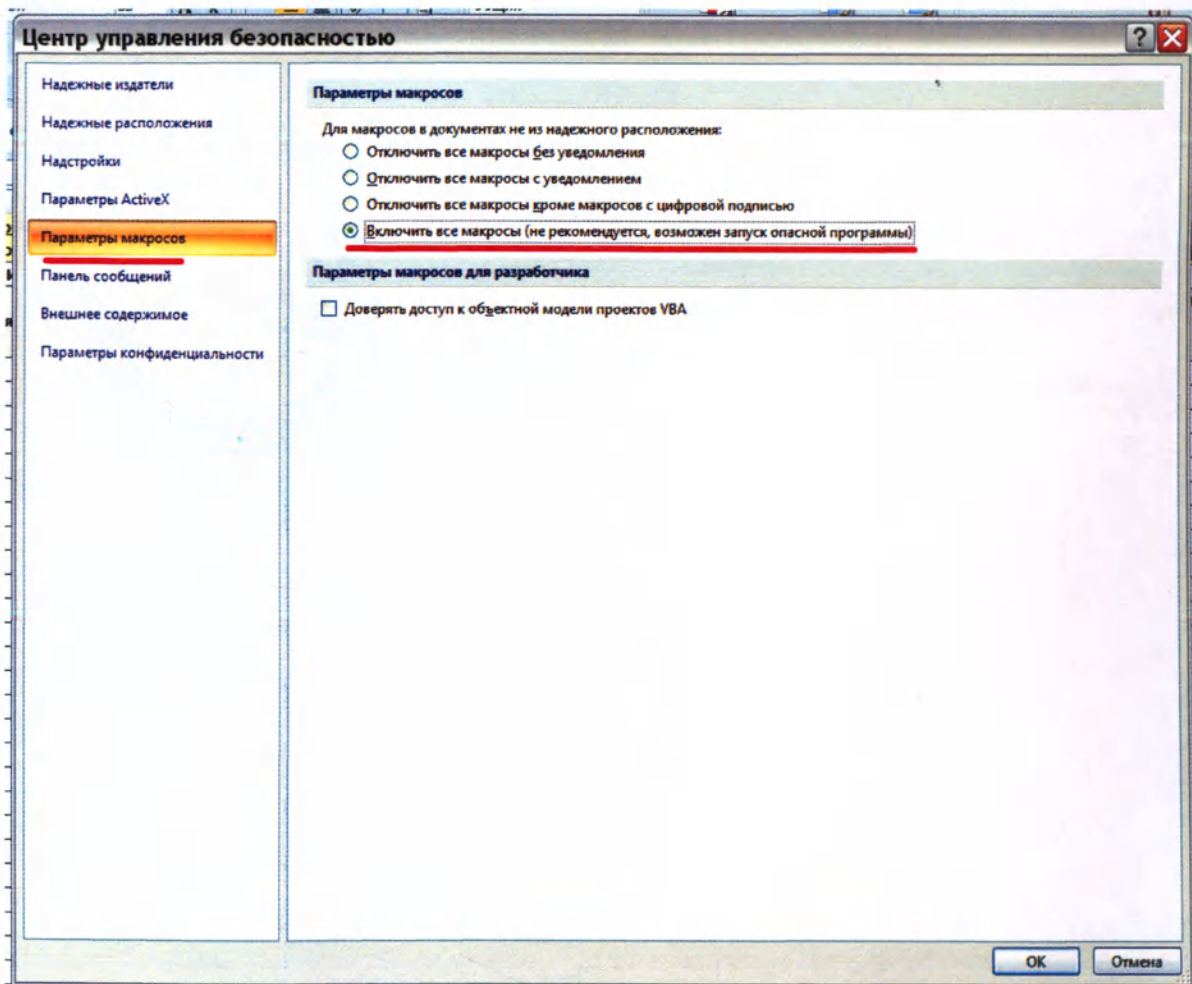
Это же меню в Microsoft Office 2013 находится во вкладке «Файл» и выглядит следующим образом:



В появившемся окне выберите вкладку «Центр управления безопасностью» и нажмите на кнопку «Параметры центра управления безопасностью»



В появившемся окне выберите вкладку «Параметры макросов» и включите все макросы.



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 44 ЛИСТОВ

«30» 11 2019 год



ген. директор
ООО «ВСЁ-МЕД-ЦЕНТР»
Варнавичу С.П.К.