

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора

Кутырев В.В.

« 22 » _____ 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
(ГЕНПЕСТ – ИДЕНТИФИКАЦИЯ - РГФ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для идентификации штаммов возбудителя чумы методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (ГенПест - идентификация – РГФ), далее - набор реагентов «ГенПест - идентификация – РГФ», предназначен для выявления чумного микроба и дифференциации вирулентных изолятов от авирулентных, выделенных из клинического, биологического материала и проб из объектов окружающей среды, методом мультилокусной 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

Идентификация штаммов возбудителя чумы методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени основано на амплификации

- гена *pla* на плазмиде *pPst* чумного микроба с образованием флуоресценции по каналу FAM,
- локуса *3a* на хромосоме чумного микроба с образованием флуоресценции по каналу JOE,
- гена *cafI* на плазмиде *pFra* чумного микроба с образованием флуоресценции по каналу ROX,
- гена *hmsH* на хромосоме чумного микроба с образованием флуоресценции по каналу FAM,
- гена *irp2* на хромосоме чумного микроба с образованием флуоресценции по каналу JOE,

- гена *lcrV* на плазмиде *pCad* чумного микроба с образованием флуоресценции по каналу ROX

Вирулентные штаммы чумного микроба содержат в составе хромосомы полноценную область пигментсорбции (*pgm*) и плазмиду *pCad*, тогда как авирулентные изоляты – лишены одной или обеих детерминант вирулентности. Детекцию области пигментсорбции проводят на основании наличия генов *hmsH* и *irp2*, детекцию плазмиды *pCad* - на основании наличия гена *lcrV*.

Проведение анализа включает два основных этапа: выделение ДНК из проб чистых культур, амплификация участков ДНК возбудителя чумы на приборе типа **Rotor Gene** и регистрация с помощью программного обеспечения кривых флуоресценции.

Амплификация фрагмента ДНК генов *3a*, *pla*, *cafI* происходит в одной реакционной смеси при использовании ПЦР-смеси-К1, генов *hmsH*, *irp2*, *lcrV* – ПЦР-смеси-К2. 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.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

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

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-К1	Смесь праймеров, дНТФ и натрия азида, сухая, в виде розоватого осадка; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок
ПЦР-смесь-К2	Смесь праймеров, дНТФ и натрия азида, сухая, в виде розоватого осадка; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок
ПЦР-смесь-РГФ	прозрачная фиолетовая жидкость, содержащая Трис-НСl; калия хлорид; магния хлорид; Tween-20, глицерин	0,6	2 пробирки
Растворитель	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой H ₂ O, свободную от нуклеаз	0,6	2 пробирки
Taq ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,024	1 пробирка
ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl; Na ₂ -ЭДТА	5,0	2 пробирки
ПКО ДНК <i>Y. pestis</i>	препарат ДНК <i>Y. pestis</i> , сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	6 пробирок

Набор реагентов «ГенПест - идентификация – РГФ» рассчитан на 60 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 ПБ	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 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 «Axygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», 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 «ГенПест - идентификация – 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 «ГенПест - идентификация – РГФ» – ПЦР-смесь-К1, ПЦР-смесь-К2, ПЦР-смесь-РГФ, Растворитель, ТЕ-буфер, ПКО ДНК *Y. pestis* при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С, Таq ДНК-полимераза - при температуре от минус 16 до минус 20 °С. Срок годности - 9 месяцев.

Условия эксплуатации набора реагентов «ГенПест - идентификация – РГФ» – при температуре от 18 до 25 °С. Срок хранения сухих компонентов ПЦР-смесь-К1, ПЦР-смесь-К2, ПКО ДНК *Y. pestis* после растворения – 2, 2 и 6 месяцев, соответственно.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Использование набора реагентов «ГенПест - идентификация – 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 чумного микроба или подозрительных изолятов.

Из культур чумного микроба или подозрительных изолятов готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для *Y. pestis*. Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^4 м.к./мл.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

10.1 Обеззараживание материала:

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с МУ 1.3.2569 - 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации

нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

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.

10.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб В», «Рибо-преп» или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанным наборам.

10.3 Проведение ПЦР – амплификация ДНК

10.3.1. Подготовка ПКО ДНК *Y. pestis*

Перед началом работы готовят ПКО ДНК *Y. pestis*. 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 *Y. pestis* хранят при температуре минус 20°C .

10.3.2. Подготовка реакционной смеси

Проведение исследований с набором реагентов «ГенПест- идентификация – РГФ» включает одномоментную постановку реакции в двух пробирках для каждой исследуемой пробы или контрольного образца. В одной пробирке используется ПЦР-смесь-К1 (предназначена для амплификации фрагментов генов *pla*, *3a* и *cafI*), во второй - ПЦР-смесь-К2 (предназначена для амплификации генов *hmsH*, *irp2* и *lcrV*). Taq-полимераза и «ПЦР-смесь- РГФ» используются с обеими реакционными смесями («К1» и «К2») одинаково.

Из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь-К1, ПЦР-смесь-К2, ПЦР-смесь-РГФ, ТЕ-буфер, из морозильной камеры извлекают Taq ДНК-полимеразу и ПКО ДНК *Y. pestis*. Пробирку с ПКО ДНК *Y. pestis* 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 для каждой ПЦР-смеси (К1, К2) из расчета: количество исследуемых проб, ОКВ, положительный контроль (К+) и отрицательный контроль (К-).

Отбирают необходимое количество пробирок «ПЦР-смесь-К1» и «ПЦР-смесь-К2» из расчета, что одна пробирка рассчитана на 12 реакций. В пробирки добавляют 60 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. Разведенную ПЦР-смесь-1 хранят при температуре плюс 4°C не более 2 месяцев.

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-К1 или К2	5
ПЦР-смесь-РГФ	10
Тақ ДНК-полимераза	0,2

Подготовленную смесь тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе.

10.3.3. Подготовка реакционных пробирок

Для проведения реакции в штатив отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл. Затем в пробирки вносят по 15 мкл подготовленной реакционной смеси (п. 10.3.2.).

Затем в пробирки вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и ОКВ. В микропробирку с отрицательным контролем амплификации (К-) вносят 10 мкл ТЕ-буфера, в микропробирку с положительным контролем амплификации (К+) - 10 мкл ПКО ДНК *Y. pestis*.

10.3.4. Проведение термоциклирования

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- 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 - 5 мин

8.2. Cycling/Циклирование 95 °C - 30 с

60 °C - 30 с

72 °C - 30 с

Cycle repeats/Цикл повторить – 10

times/раз.

8.3. Cycling2/Циклирование2 95 °C - 20 с

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, JOE/Yellow, ROX/Orange.

8.4. Нажимают кнопку «OK»/«Да».

9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт. уровня сигн.». В открывшемся окне нажимают кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/ «Опт. детек-мых». Для красителей FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange 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 (ПЦР-смесь «K1»). Помечают галочкой бокс в строке «*Perform Calibration Before 1st Acquisition*»/«*Perform Optimisation Before 1st Acquisition*»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывают окно *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала*, нажимают кнопку «Close»/«Закреть». Нажимают кнопку «Next»/«Далее».

10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт».

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

Регистрацию результатов реакции с использованием ПЦР-смеси-K1 и ПЦР-смеси-K2 проводят единообразно.

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», «Slope Correct»/«Коррек. уклона», «Ignore First - 10 Cycles»/«Игнор. первые - 10 циклов».

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, «Eliminate Cycles Before - 8»/«Исключить циклы до - 8».

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», «Slope Correct»/«Коррек. уклона», «Ignore First - 10 Cycles»/«Игнор. первые - 10 циклов».

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, «Eliminate Cycles Before - 8»/«Исключить циклы до - 8».

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

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange:

Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. ROX»/«Cycling A. Orange», 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», «Slope Correct»/«Коррек. уклона», «Ignore First - 10 Cycles»/«Игнор. первые - 10 циклов».

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) – 5 %.

5. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05, «Eliminate Cycles Before - 8»/«Исключить циклы до - 8».

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).

Пороговое значение Ct для положительных проб по каналам FAM, JOE, ROX с ПЦР-смесью-К1, ПЦР-смесью-К2 составляет во всех случаях 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 значение (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 каналам					
	ПЦР-смесь-К1			ПЦР-смесь-К2		
	FAM (Green)	JOE (Yellow)	ROX (Orange)	FAM (Green)	JOE (Yellow)	ROX (Orange)
К+	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33
К-	ОФ	ОФ	ОФ	ОФ	ОФ	ОФ
ОКВ	ОФ	ОФ	ОФ	ОФ	ОФ	ОФ
Примечание: ОФ – отсутствие флуоресценции						

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей.

Пробы	Значения порогового цикла (Ct) по каналам						Результат анализа
	ПЦР-смесь-K1			ПЦР-смесь-K2			
	FAM (Green)	JOE (Yellow)	ROX (Orange)	FAM (Green)	JOE (Yellow)	ROX (Orange)	
	<i>pla</i>	<i>3a</i>	<i>cafI</i>	<i>hmsH</i>	<i>irp2</i>	<i>lcrV</i>	
Исследуемые пробы	≤ 33 или ОФ	≤ 33	≤ 33 или ОФ	≤ 33	≤ 33	≤ 33	Положительный В пробе выявлена ДНК вирулентного штамма чумного микроба , содержащего полноценную область пигментсорбции (pgm+) и плазмиду pCad
	≤ 33 или ОФ	≤ 33	≤ 33 или ОФ	ОФ	ОФ	≤ 33	Положительный В пробе выявлена ДНК авирулентного штамма чумного микроба , у которого отсутствует полноценная область пигментсорбции (pgm-)
	≤ 33 или ОФ	≤ 33	≤ 33 или ОФ	≤ 33	≤ 33	ОФ	Положительный В пробе выявлена ДНК авирулентного штамма чумного микроба , у которого отсутствует плазмид pCad
	≤ 33 или ОФ	ОФ	≤ 33 или ОФ	≤ 33 или ОФ	≤ 33 или ОФ	≤ 33 или ОФ	Отрицательный Штамм не относится к виду <i>Y. pestis</i>
Примечание: ОФ – отсутствие флуоресценции							

Примечание: ОФ – отсутствие флуоресценции

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять ДНК *Y. pestis* в суспензиях концентрацией не менее 1×10^4 м.к./мл и дифференцировать вирулентные изоляты от авирулентных по наличию полноценной области пигментсорбции и плазмиды pCad.

13.2. Аналитическая специфичность

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

13.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - не менее 98,5 % с доверительной вероятностью 90 % при исследовании 200 положительных образцов, содержащих *Y. pestis* в концентрации не менее 1×10^4 м.к./мл; не менее 98,5 % с доверительной вероятностью 90 % при дифференциации 200 образцов, содержащих вирулентные или авирулентные штаммы *Y. pestis* в концентрации не менее 1×10^4 м.к./мл.

13.4. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - не менее 99 % с доверительной вероятностью 90% при исследовании 200 положительных образцов, содержащих *Y. pestis*, в концентрации не менее 1×10^4 м.к./мл, и 60 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (*F.tularensis*, *L.pneumophila*, *B.anthraxis*, *B.abortus*, *V.cholerae*,

Enterobacter, S.aureus, S.mitis, P.vulgaris, K.pneumoniae, E.coli, P.aeruginosa, M.morganii, Y.pseudotuberculosis), в концентрации не менее 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 «ГенПест - идентификация – 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»



А.К.Никифоров

Генеральный директор
ООО «Вымпел-медцентр»



Ю.Н.Егоров

22 ИЮН 2015

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 10 ЛИСТОВ
« » 201 год

22 ИЮН 2015

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

