

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора
Кутырев В.В.
« 21 » 10 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ГЕНТУЛ – ИНДИКАЦИЯ - РГФ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя туляремии методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (ГенТул - индикация – РГФ), далее - набор реагентов «ГенТул – индикация - РГФ», предназначен для выявления ДНК возбудителя туляремии в клиническом, биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным 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 ДНК возбудителя туляремии методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени основано на амплификации фрагмента *iglBC* генов *Francisella tularensis* с образованием флуоресценции по каналу ROX.

Проведение анализа включает два основных этапа: выделение ДНК из проб клинического материала, амплификация участка ДНК возбудителя туляремии на приборе типа **Rotor Gene** и регистрация с помощью программного обеспечения кривых флуоресценции.

Амплификация фрагмента ДНК происходит в буферном растворе за счет праймеров, комплементарных последовательности *iglBC* генов тулярийного микроба, олигонуклеотидного зонда типа TaqMan с флуоресцентными метками ROX-BHQ2, 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-полимераза (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 6 реагентов:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-1	Смесь праймеров, дНТФ и натрия азида, сухая, в виде сиреневатого 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	1 пробирка
Растворитель	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой Н ₂ О, свободную от нуклеаз	0,6	1 пробирка
Тaq ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,012	1 пробирка
ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl; Na ₂ -ЭДТА	5,0	2 пробирки
ПКО ДНК <i>F. tularensis</i>	препарат ДНК <i>F. tularensis</i> , сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	3 пробирки

Набор реагентов «ГенТул - индикация - 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 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 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

Набор реагентов «ГенТул – индикация - РГФ» должен транспортироваться всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями ГОСТ 15150 и правилами, установленными для каждого вида транспорта. Условия транспортирования - при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 2 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С – в течение срока годности.

Условия хранения – ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-РГФ, Растворитель, ТЕ-буфер, ПКО ДНК *F. tularensis* 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 «ГенТул – индикация - РГФ» – при температуре от 18 до 25 °С.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Использование набора реагентов «ГенТул – 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:

- пробы чистых культур микроорганизмов: бактериальные суспензии культур туляремиального микроба или подозрительных изолятов;
- пробы клинического материала: кровь, мокрота, промывные воды бронхов, мазок из носоглотки, пунктаты бубона, отделяемое язв;
- пробы биологического материала: органы грызунов, зайцеобразных, насекомоядных и наземных хищников; эктопаразиты (блохи, клещи, комары); остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников;
- пробы объектов окружающей среды: почва, вода открытых водоемов.

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично закрывающимися 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 °C 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 °C в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды следующего состава: сахараза 0,218 моль, KH_2PO_4 0,0038 моль, K_2HPO_4 0,0072 моль; БСА 1%. При необходимости длительного хранения и (или) транспортирования, при отсутствии низкотемпературных холодильников, используют специальную транспортную среду ESP: саркозил 1%; ЭДТА 0,05 моль; проназа Е 1 мг/мл. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при температуре от плюс 20 до плюс 30 °C в темном месте до 10 дней.

9.1. Подготовка проб чистых культур микроорганизмов. Из культур туляремиального 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 5×10^9 м.к./мл 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. Подготовка проб клинического материала:

9.2.1. Кровь

Кровь у людей берут из локтевой вены в количестве 4,5 мл с помощью одноразовой иглы (диаметр 0,8-1,1 мм) и специальной вакуумной системы типа «Vacuett» с ЭДТА или цитратом натрия, или стерильным шприцем в стерильные стеклянные или пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.2.2. Мокрота

Мокроту забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл. Для разжижения мокроты применяют либо приготовленную *ex tempore* смесь NALC (N-ацетил-L-цистеина 0,25 г, 25 мл 4 % раствора NaOH, 25 мл 0,1 моль гризамещенного натрия цитрата), либо раствор «Муколизин» (Na_2HPO_4 0,0774 моль, NaH_2PO_4 0,0226 моль, бета-МЭ 0,094 моль, 5 % азид натрия в конечной концентрации 0,05 %). Пробу объемом 1-2 мл смешивают либо с равным объемом смеси NALC, либо с пятикратным объемом раствора «Муколизин». Пробу со смесью NALC перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 15 мин, периодически встряхивая. Затем разводят фосфатным буфером 0,067 моль (pH 6,8) до конечного объема 50 мл. Пробу центрифугируют в течение 10 мин при 9000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Пробу с раствором «Муколизин» перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 20-30 мин, периодически встряхивая. Затем отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой и центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.2.3. Промывные воды бронхов

Для получения промывных вод бронхов при бронхоскопии вводят до 7 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. После чего 2-3 мл лаважной жидкости отбирают в стерильную пробирку. Из пробы отбирают 1 мл и помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.2.4. Мазок из носоглотки

Взятие мазка из носоглотки проводят натошак или не ранее, чем через 2-4 часа после еды. Корень языка придавливают шпателем, материал берут стерильным зондом, не касаясь языка, слизистой полости рта, зубов, и помещают в пробирку с транспортной средой или 0,9 % раствором натрия хлористого объемом 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.2.5. Пунктаты bubона, отделяемое язв

Забор материала язвы или bubона производят стерильным шприцем. Если bubон имеет сохранившуюся кожу (невскрывшийся bubон), то ее протирают предварительно спиртом. Пункцию bubона производят как в его центре, так и на периферии. Из вскрывшегося bubона материал забирают в местах с сохраненной тканью, а также берут отделяемое bubона. Исследуемый материал в количестве не менее 100 мкл помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой или 0,9 % раствором натрия хлористого объемом 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.3. Подготовка проб биологического материала

9.3.1. Пробы органов лабораторных и диких 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 хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.3.2. Пробы эктопаразитов (клещи, комары, блохи).

Клещей, блох и комаров 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 0,9 % раствора натрия хлористого и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром или стеклянной пипеткой переносят пробу в микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 2 мин для осветления пробы. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96%-ного этанола, встряхивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют в течение 3-5 с при 2000 об/мин для удаления капель с крышки пробирки. После удаления из пробирки спирта, вносят 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлористого, встряхивают и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 3-5 с при 2000 об/мин. Раствор натрия хлористого удаляют из пробирки. Переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7-1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлористого и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром или стеклянной пипеткой переносят гомогенизированную пробу в микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 2 мин для осветления пробы. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.3.3. Погадки хищных птиц, экскременты грызунов и хищников

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 ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.4. Подготовка проб из объектов окружающей среды

9.4.1. Почва

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы 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 ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.4.2. 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 завинчивающейся 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 завинчивающейся 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 объемом 100 мл, содержащих 10 мл 0,9 % раствора натрия хлористого. Фильтр внутри пакета растирают вручную в течение 1 мин. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1,0 мл в микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся 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.

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 *F. tularensis*

Перед началом работы с набором готовят ПКО ДНК *F. tularensis*. 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

течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки. После растворения ПКО ДНК *tularensis* хранят при температуре минус 20 °С.

10.3.2. Подготовка реакционной смеси

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

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

Отбирают необходимое количество пробирок «ПЦР-смесь-1» 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 °С 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-1	5
ПЦР-смесь-РГФ	10
Таq 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 *F. tularensis*.

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

1. Нажимают кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер». Нажимают кнопку «New»/«Новый».
3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
5. Выбирают объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene 6000» должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, ставят ее с помощью мышки).
6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».

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

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.

Флюоресценцию измеряют при 56 °C (во втором блоке циклирования) по каналу ROX/Orange.

8.4. Нажимают кнопку «OK»/«Да».

- 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 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»/«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 в меню *Samples/Образцы* как *Unknown/Неизвестный*.

11. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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» 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) – 5 %*.
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 (Ct).

2. 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 каналу ROX составляет не более 32. Если значение (Ct) более 32, требуется повторить ПЦР. Если при повторном исследовании получено значение (Ct) не более 32, результат считают положительным. При повторном получении значения (Ct) более 32, требуется повторить весь анализ, начиная с этапа подготовки проб.

Учет результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения отрицательного (K+), отрицательного (K-) контролей амплификации и ОКВ.

Контроли	Значения порогового цикла (Ct) по каналу ROX (Orange)
K+	≤ 32
K-	Отсутствие флуоресценции
ОКВ	Отсутствие флуоресценции

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей.

Пробы	Значения порогового цикла (Ct) по каналу ROX (Orange)	Результат анализа
Исследуемые пробы	≤ 32	Положительный/ В пробе выявлена ДНК <i>F. tularensis</i>
	Отсутствие флуоресценции	Отрицательный/ В пробе ДНК <i>F. tularensis</i> не обнаружена

13. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

13.1. Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять ДНК *F. tularensis* в суспензии концентрацией не менее 1×10^3 м.к./мл.

13.2. Аналитическая специфичность.

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

13.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - не менее 98,5 % с доверительной вероятностью 90%. При исследовании 208 положительных проб (124 пробы бактериальных суспензий микроорганизмов и 84 пробы клинического, биологического материала и объектов окружающей среды), содержащих *F. tularensis* в концентрации 1×10^3 м.к./мл, положительный результат получен в 208 случаях.

13.4. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - не менее 99 % с доверительной вероятностью 90%. При исследовании 208 положительных проб, содержащих возбудитель туляремии, положительный ответ получен в 208 случаях, при исследовании 60 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации 1×10^4 м.к./мл, отрицательный результат в ПЦР получен во всех 60 случаях.

БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

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

ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя туляремии методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (ГенТул - индикация – РГФ)» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

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) 51-9-65.

ам. директора по экспериментальной и
производственной работе ФКУЗ
осНИПЧИ «Микроб»

генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



А.К. Никифоров

Ю.Н. Егоров