

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

Роспотребнадзора

Кутырев В.В.

« 27 » марта 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ*
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ
(ОТДЕЛЬНО АЛТАЙСКОГО) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В
РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ГЕНПЕСТ-ПОДВИД/АЛТАЙ-РГФ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)», далее - набор реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ», предназначен для качественного выявления ДНК возбудителя чумы в пробах клинического материала (кровь, мокрота, мазок из зева, моча, пунктаты бубона, отделяемое язв, фекалии, ликвор); биологического материала (органы, экскременты грызунов и хищников, эктопаразиты, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки), объектов окружающей среды (почва), культур микроорганизмов с одновременным определением его принадлежности к основному и неосновным подвидам, дифференциацией отдельно неосновного алтайского подвида методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

Чума - острое инфекционное хорошо изученное заболевание, относящееся к природно-очаговому зоонозным трансмиссивным заболеваниям, носителем которого являются дикие грызуны, а переносчиками - эктопаразиты. Заражение человека в природных очагах происходит при укусе инфицированными блохами, контакте с больными и погибшими от чумы грызунами, при забое и разделке больных чумой промысловых и домашних животных. Чума может передаваться и от человека к человеку как антропонозное заболевание, а также при контакте с трупами или вещами умершего больного чумой человека.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования материала, полученного от лиц обоего пола любого возраста с подозрением на чуму вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания (контактных и проживающих на территории природных очагов чумы), а также в ходе эпидемиологического мониторинга природных очагов чумы для исследования биологического материала от животных-носителей и переносчиков чумы, объектов окружающей среды.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

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

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-вид	Смесь праймеров, зонда, дНТФ и натрия азида – прозрачная розоватая жидкость	0,25	1 пробирка
ПЦР-смесь-подвид	Смесь праймеров, зондов, дНТФ и натрия азида – прозрачная розоватая жидкость	0,25	1 пробирка

***Введена впервые**

ПЦР-смесь-РГФ	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-HCl; калия хлорид; магния хлорид; Tween-20, глицерин, азид натрия	0,5	2 пробирки
Растворитель	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой H ₂ O, свободную от нуклеаз	1,0	1 пробирка
Taq ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,04	1 пробирка
TE-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-HCl; Na ₂ -ЭДТА	1,0	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	3 пробирки

Набор реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» рассчитан на 50 определений с учетом контрольных образцов.

В основу метода положен анализ наличия или отсутствия фрагментов генома чумного микроба методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

Выявление ДНК чумного микроба проводят на основании амплификации видоспецифичного хромосомного *ilvN* гена с использованием ПЦР-смеси-вид. Учет результатов реакции с данной смесью проводят по каналу FAM (Green).

Для определения принадлежности возбудителя чумы к основному, неосновным подвидам и дифференциации отдельно неосновного алтайского подвида проводят амплификацию *ilvN* и AK38_1327 генов с использованием ПЦР-смеси-подвид. Учет результатов реакции с данной смесью проводят по каналу FAM (Green) – *ilvN* ген, JOE (Yellow) – AK38_1327 locus.

При проведении реакции с ПЦР-смесью-подвид у штаммов чумного микроба основного подвида будет отсутствовать специфичная амплификация по каналу FAM (Green) (из-за наличия у *Y. pestis pestis* делеции в гене *ilvN*), а у штаммов возбудителя чумы неосновного алтайского подвида – по каналу JOE (Yellow) (из-за наличия у *Y. pestis altaica* делеции в локусе AK38_1327).

В результате проведения анализа регистрация флуоресценции с обеими ПЦР-смесьюми у штаммов чумного микроба будет следующая: основной подвид – FAM_{вид} + FAM_{подвид} – JOE_{подвид}⁺; неосновной алтайский подвид – FAM_{вид} + FAM_{подвид} + JOE_{подвид}⁺; неосновных (кроме алтайского) подвида – FAM_{вид} + FAM_{подвид} + JOE_{подвид}⁺.

Проведение анализа включает два этапа: 1. выделение ДНК из проб клинического и биологического материала, объектов окружающей среды 2. амплификация с «ПЦР-смесью-вид» и «ПЦР-смесью-подвид» на приборах типа Rotor Gene. Тип используемых зондов – TaqMan. Образование флуоресцентного сигнала происходит за счет освобождения флуоресцентных меток при расщеплении зонда ферментом Taq ДНК-полимераза (5'-эксонуклеазная 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 чумного микроба в суспензиях концентрацией не менее 1×10³ м.к./мл и определять принадлежность патогена к основному и неосновным

подвидам с дифференциацией отдельно штаммов *Y. pestis* неосновного алтайского подвида.

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 98,5 % с доверительной вероятностью 90%; при анализе 242 положительных проб (32 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 112 проб клинического материала, 84 проб биологического материала и 14 проб объектов окружающей среды), содержащих *Y. pestis* в концентрации 1×10^3 м.к./мл, получен положительный результат с верной дифференциацией по принадлежности к основному, алтайскому подвиду и остальным неосновным подвидам - в 242 случаях;

3.4. Диагностическая специфичность - не менее 99 % с доверительной вероятностью 90%; при анализе 242 положительных проб (32 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 112 проб клинического материала, 84 проб биологического материала и 14 проб объектов окружающей среды), содержащих *Y. pestis* в концентрации 1×10^3 м.к./мл, получен положительный результат с верной дифференциацией по принадлежности к основному, алтайскому подвиду и остальным неосновным подвидам - в 242 случаях, при исследовании 70 отрицательных проб (48 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 10 проб клинического материала, 10 проб биологического материала и 2 проб объектов окружающей среды), содержащих гетерологичные микроорганизмы *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis*, *Enterobacter kobei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter yange*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* в концентрации 1×10^4 м.к./мл, получен отрицательный результат в 70 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 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 «ГенПест-подвид/алтай-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
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 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 4.2.2940-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней»):

- пробы культур микроорганизмов: бактериальные суспензии культур чумного микроба или подозрительных изолятов;
- пробы клинического материала: кровь, мокрота, мазок из зева, моча, пунктаты бубона, отделяемое язв, фекалии, ликвор;
- пробы биологического материала: органы грызунов, зайцеобразных, насекомоядных и наземных хищников, эктопаразиты (блохи, клещи), остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников;
- пробы объектов окружающей среды: почва.

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 °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: сахара - 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 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 42-28-59-86П), 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 1×10^6 - 1×10^4 м.к./мл.

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. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Мокрота

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

Мазки из зева

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

Моча

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

Пунктат из бубона, отделяемое кожных элементов

Пунктат из бубона, отделяемое язв (везикул, пустул, карбункулов) берут шприцем емкостью не менее 5 мл. Кожу на участке, намеченном для прокола, обрабатывают 70° спиртом, а затем смазывают 5 % раствором йода и вновь протирают 70° спиртом. Иглу вводят с таким расчетом, чтобы ее острое достигло центральной части бубона, после чего, оттянув до отказа поршень, медленно вытягивают иглу. После извлечения иглы из бубона через нее набирают в шприц 0,5 мл стерильного питательного бульона (рН 7,2), содержимое выливают в стерильную пробирку и закрывают стерильной резиновой пробкой. Бульон можно набирать в шприц и до начала пункции. При вскрывшемся бубоне забирают материал отдельно из периферической плотной части и отделяемое свища. Обе порции исследуют отдельно. При кожных поражениях иглу шприца вводят у края везикулы (пустулы) и затем продвигают к середине. У карбункулов и язв пунктируют плотный край.

Фекалии

Жидкие фекалии переносят по 1-5 мл в микроцентрифужные пробирки с завинчивающимися крышками. Пробирки центрифугируют при 9000 об/мин в течение 5 мин. Затем отбирают по 0,2 мл верхней бело-желтой части осадка (если отсутствует бело-желтый пограничный слой или полностью осадок, то отбор производят на границе осадка и супернатанта или со дна пробирки, соответственно) и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой. Пробирки центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

К плотным фекалиям добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого в соотношении 1:9, тщательно ресуспендируют с использованием микроцентрифуги-встряхивателя. Отбирают по 1 мл в микроцентрифужные пробирки. Дальнейшую подготовку проводят так же как при исследовании жидких испражнений. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Ликвор

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

7.1.3. Подготовка проб биологического материала

Органы 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 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.

Эктопаразиты (блохи, клещи)

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

Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.1027-01 "Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих - переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций".

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

Клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96% этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3 - 5 с при 2000 об/мин для удаления капель с крышки пробирки. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки. Вносят в пробирку 1 мл 0,15 моль раствора натрия хлористого, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3 - 5 с при 2000 об/мин. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют раствор натрия хлористого из пробирки. Переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7-1,0 мл 0,15 моль раствора натрия хлористого и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 2 мин. для осветления пробы. ДНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

Остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников

Отобранные пробы помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 % 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.

7.1.4. Подготовка проб из объектов окружающей среды

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.

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», «Рибо-преп» или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанному набору.

7.4 Проведение ПЦР – амплификация ДНК

Важно !!! Исследования проводят одновременно с ПЦР-смесью-вид» и «ПЦР-смесью-подвид».

7.4.1. 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 °С.

7.4.2. Подготовка реакционных смесей

Из холодильной камеры извлекают ПЦР-смесь-вид и ПЦР-смесь-подвид, 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 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-вид и РС-подвид. Пробирки маркируют.

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

Реакционная смесь	Реагент	Объем, мкл
РС-вид	ПЦР-смесь-вид	5
	ПЦР-смесь-РГФ	10
	Taq ДНК-полимераза	0,4
РС-подвид	ПЦР-смесь-подвид	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-вид и РС-подвид вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и ОКВ. В микропробирки с отрицательными контролями амплификации (К_{вид}⁻ и К_{подвид}⁻) вносят по 10 мкл ТЕ-буфера, в микропробирки с положительными контролями амплификации (К_{вид}⁺ и К_{подвид}⁺) – по 10 мкл ПКО ДНК *Y. pestis*.

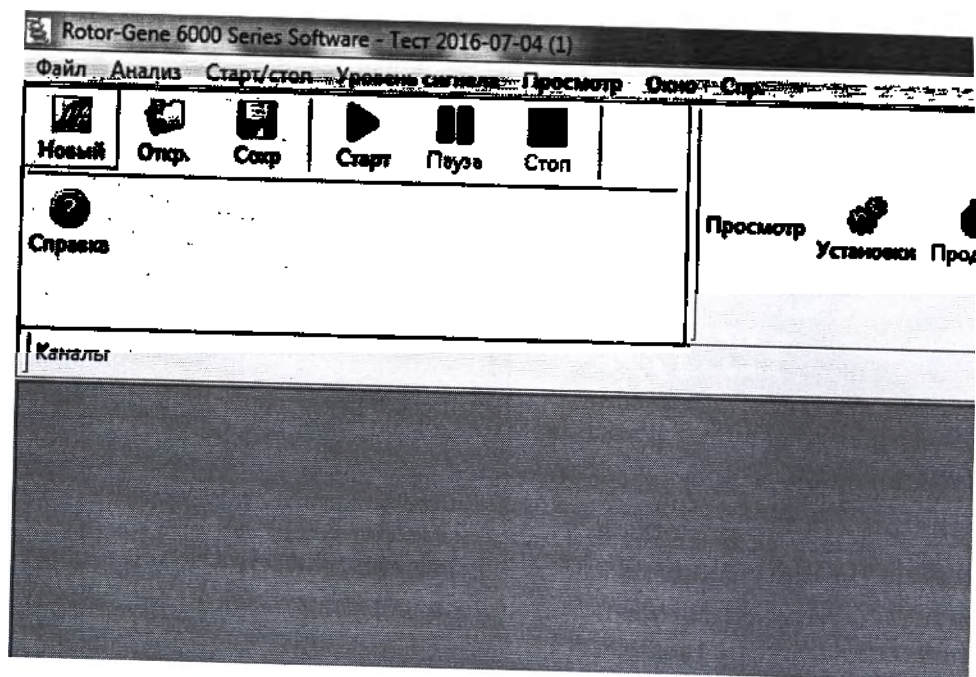
7.4.3. Проведение термоциклирования

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа RotorGene.

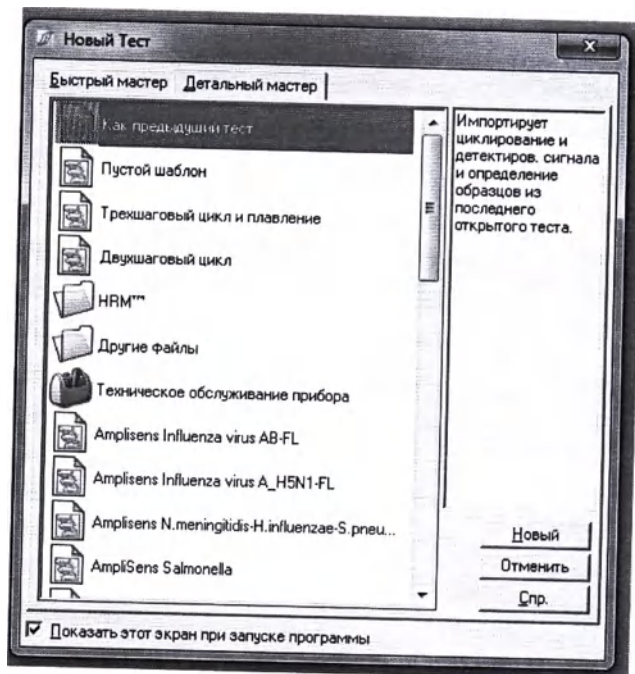
Программирование амплификатора типа RotorGene:

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.

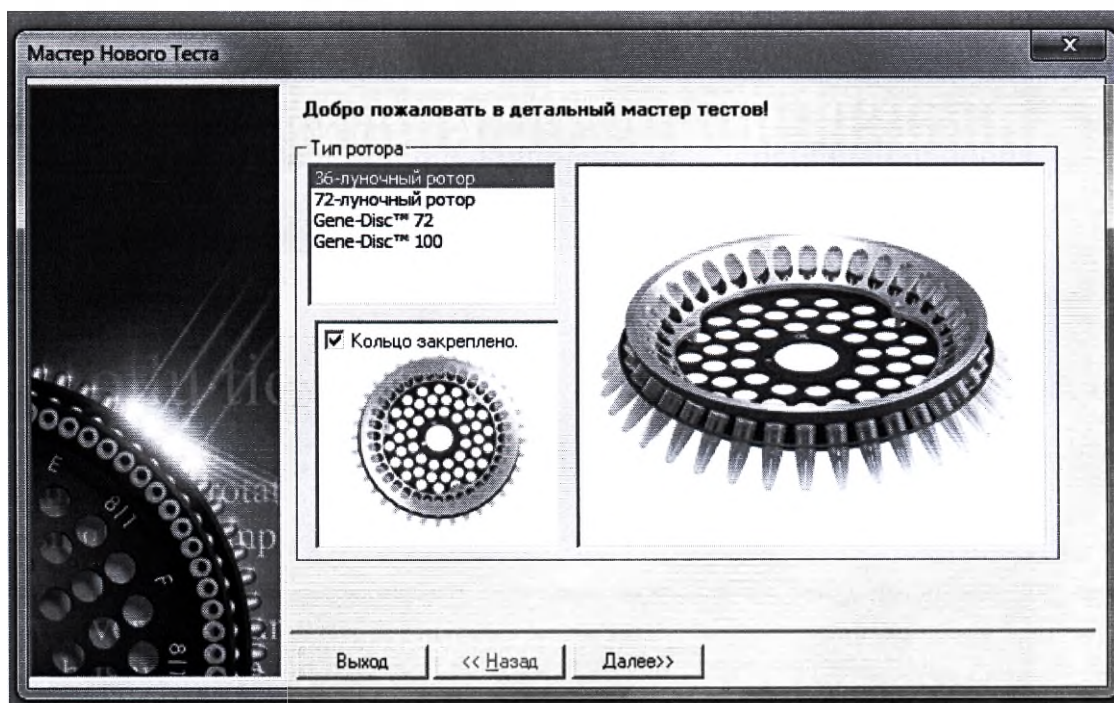
1. Нажимают кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.



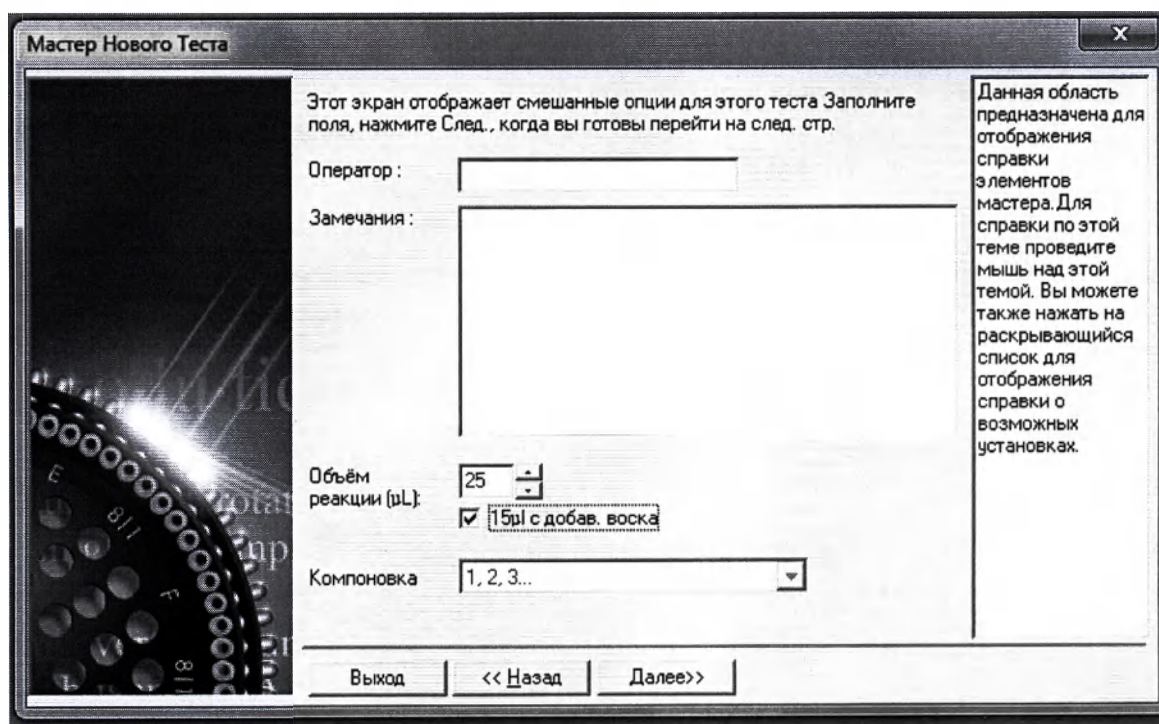
2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер» Нажимают кнопку «New»/«Новый».



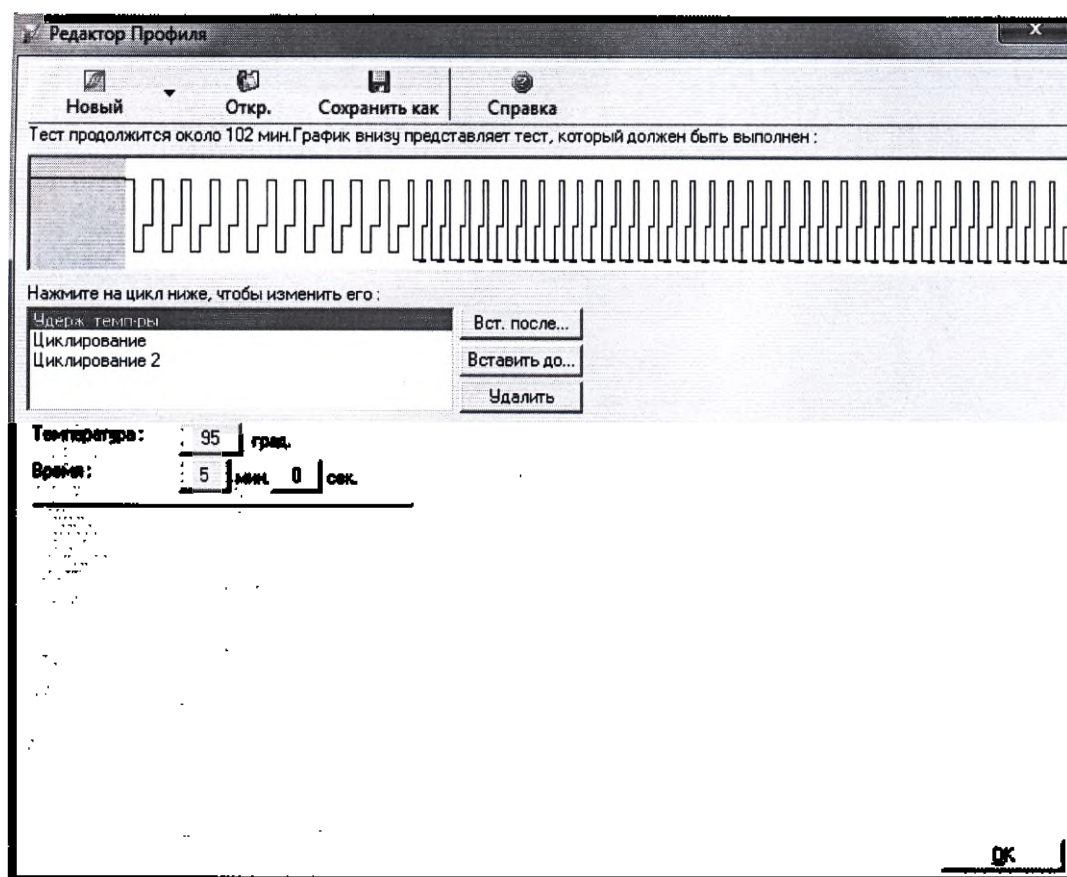
3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



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

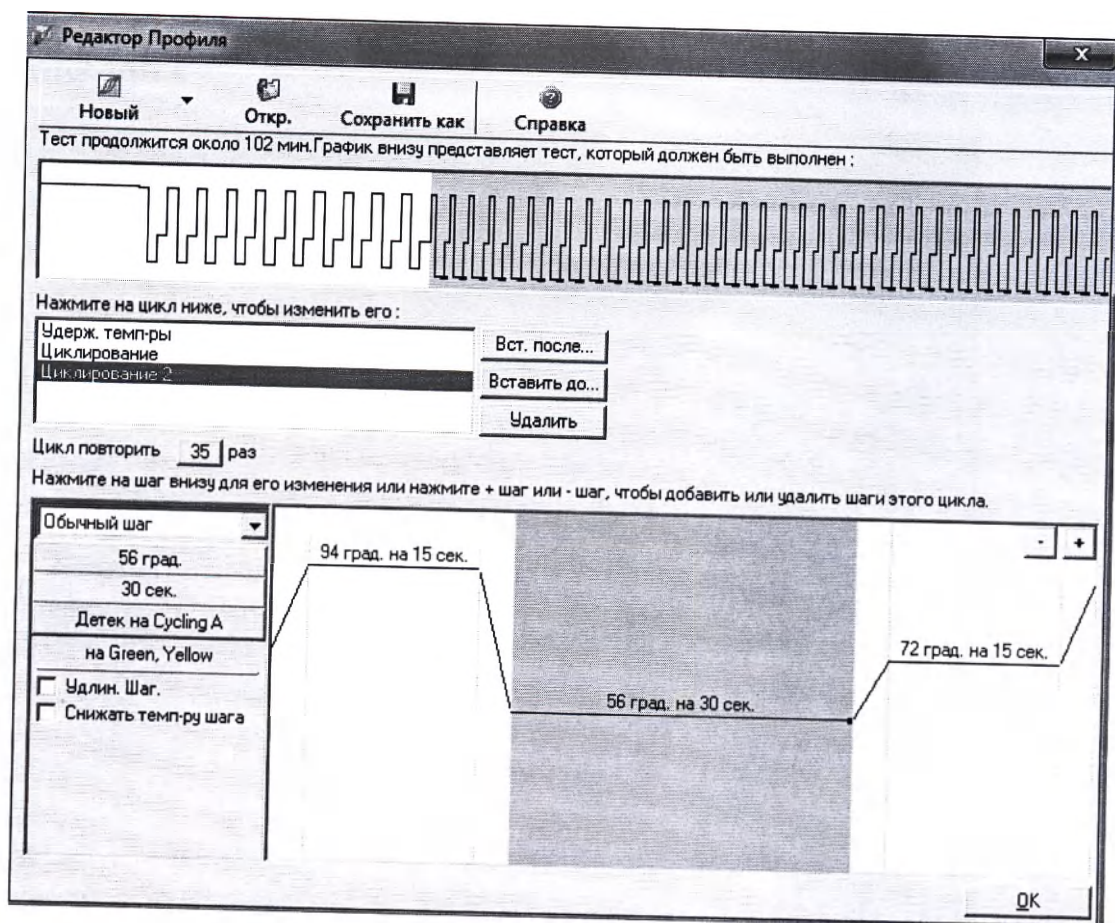
8.3. Cycling2/Циклирование2 95 °C - 15 с

56°C - 30 с - Детекция

72 °C - 15 с

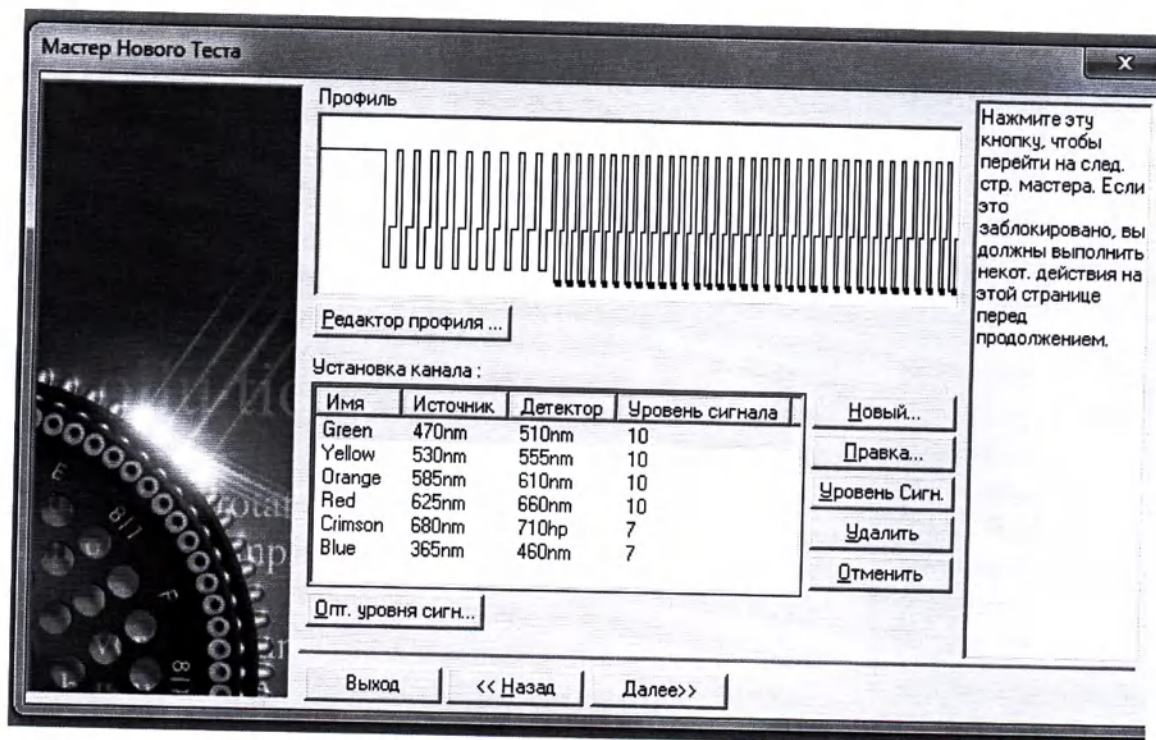
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.

Флуоресценцию измеряют при 56 °C (во втором блоке циклирования) по каналу FAM/Green, JOE/Yellow.



8.4. Нажимают кнопку «ОК»/«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-мыш».

Авто-оптимизация уровня сигнала

Оптимизация:

При авто-оптимизации уровня сигнала будет считываться флуоресцентный сигнал выбранной пробирки при различных уровнях усиления сигнала, пока не найдется уровень, при котором сигнал попадает в нужный диапазон. Уровень сигнала зависит от используемых реагентов.

Установить температуру градусов.

☐ Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции

☐ Выполнить оптимизацию при 60 градусах перед началом теста

Установки канала:

Имя	Позиция Пробирки	Миним. Сигнал	Максим. Сигнал	Мин. урое

- для красителя **FAM/Green** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **14**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **20**,
- для красителя **JOE/Yellow** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10**,

Авто-оптимизация уровня сигнала

Оптимизация:

При авто-оптимизации уровня сигнала будет считываться флуоресцентный сигнал выбранной пробирки при различных уровнях усиления сигнала, пока не найдется уровень, при котором сигнал попадает в нужный диапазон. Уровень сигнала зависит от используемых реагентов.

Установить температуру градусов.

☒ Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции

☐ Выполнить оптимизацию при 60 градусах перед началом теста

Установки Авто-оптимизации уровня сигнала

Установки канала:

Канал: Green Позиция Пробирки:

Нужный диапазон стартового сигнала: FI до FI

Диапазон уровней сигнала: до

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 РС-подвид.

Помечают галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывть окно Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала, нажимают кнопку «Close»/«Заккрыть».

Авто-оптимизация уровня сигнала

Оптимизация :

При авто-оптимизации уровня сигнала будет считываться флуоресцентный сигнал выбранной пробирки при различных уровнях усиления сигнала, пока не найдется уровень, при котором сигнал попадает в нужный диапазон. Уровень сигнала зависит от используемых реагентов.

Установить температуру 60 $\div$ градусов.

Оптим. всех Опт. Детек-мьк

☒ Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции

☐ Выполнить оптимизацию при 60 градусах перед началом теста

Установки канала :

Имя	Позиция Пробирки	Миним Сигнал	Максим. Сигнал	Мин. урс
Green	1	14FI	20FI	-10
Yellow	1	5FI	10FI	-10

Добавить...
Правка...
Удалить
Удалить все

Старт Вручную... Закрыть Спр.

Нажимают кнопку «Next»/«Далее».

Мастер Нового Теста

Профиль



Редактор профиля ...

Установка канала :

Имя	Источник	Детектор	Уровень сигнала
Green	470nm	510nm	10
Yellow	530nm	555nm	10
Orange	585nm	610nm	10
Red	625nm	660nm	10
Crimson	680nm	710hp	7
Blue	365nm	460nm	7

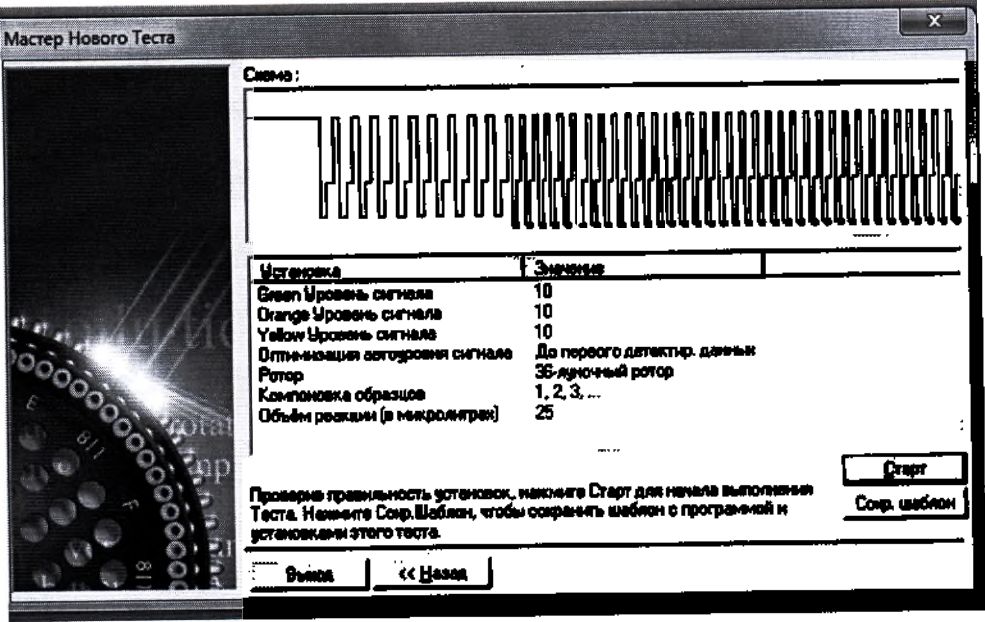
Новый...
Правка...
Уровень Сигн.
Удалить
Отменить

Выйд << Назад Далее >>

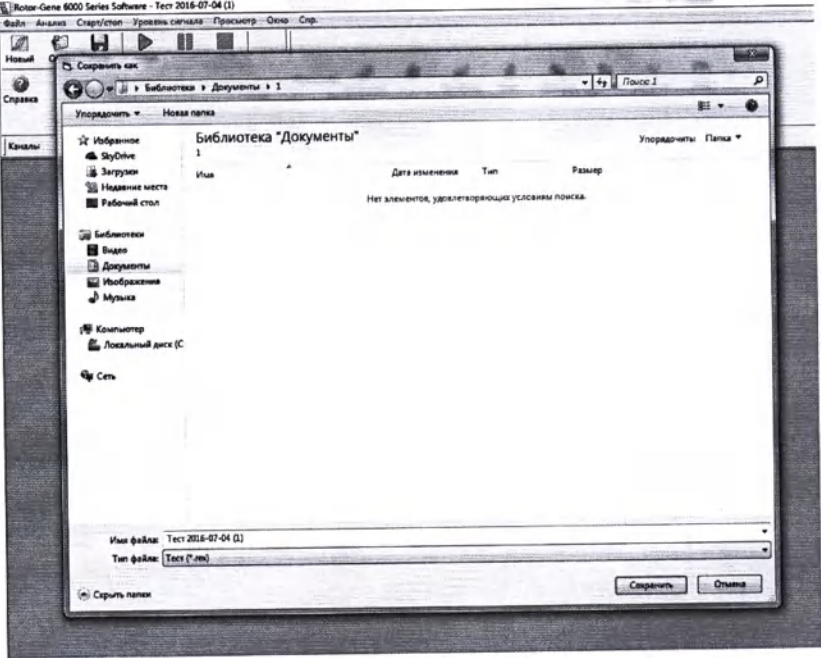
Нажмите эту кнопку, чтобы перейти на след. стр. мастера. Если это заблокировано, вы должны выполнить некот. действия на этой странице перед продолжением.

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

введенные значения термоциклирования могут быть сохранены в качестве шаблона, используя кнопку « Save template/ «Сохранить шаблон».



11. Дают название эксперименту 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.

7.4.4 Регистрация результатов

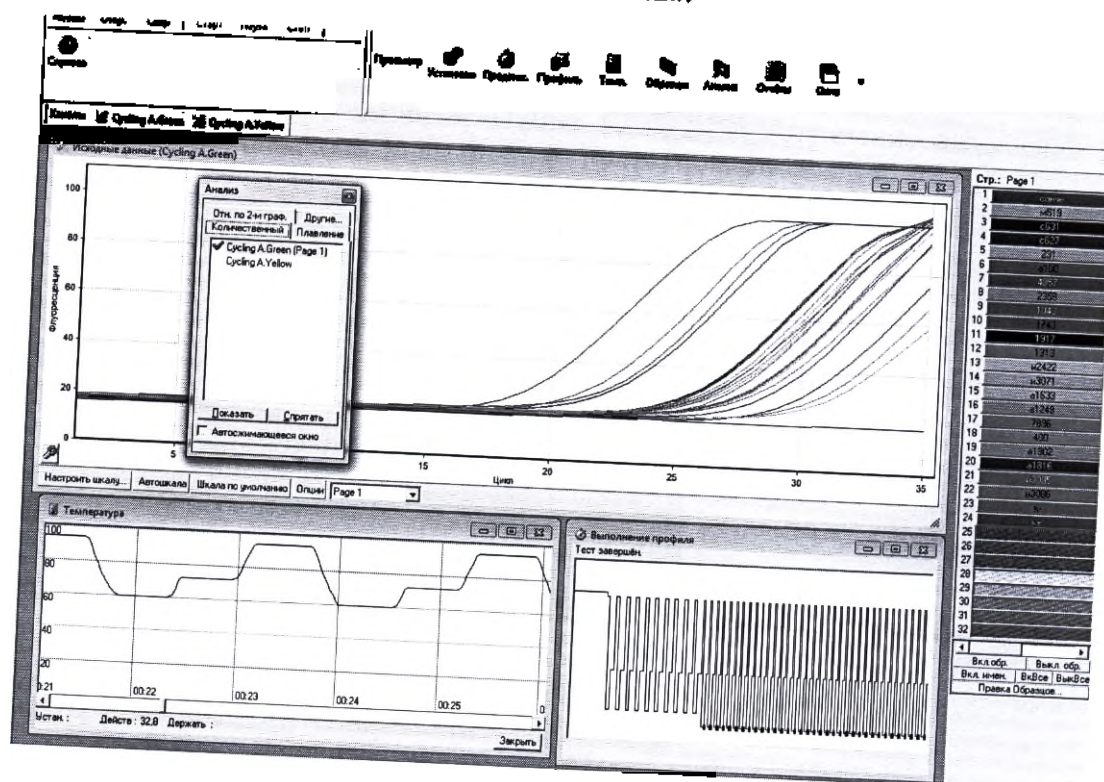
Учет данных по каналам для ПЦР-смеси-вид и ПЦР-смеси-подвид проводят единообразно. Для регистрации результатов амплификации на приборах типа Rotor Gene используют следующие показатели.

Показатели	FAM (Green)	
Наименование мишени	PC-вид	
Функция «Slope Correct»/«Коррек. уклона»	yihN	
Функция «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов»	активна	
Значения Threshold/Порог	5 %	
	0,05	

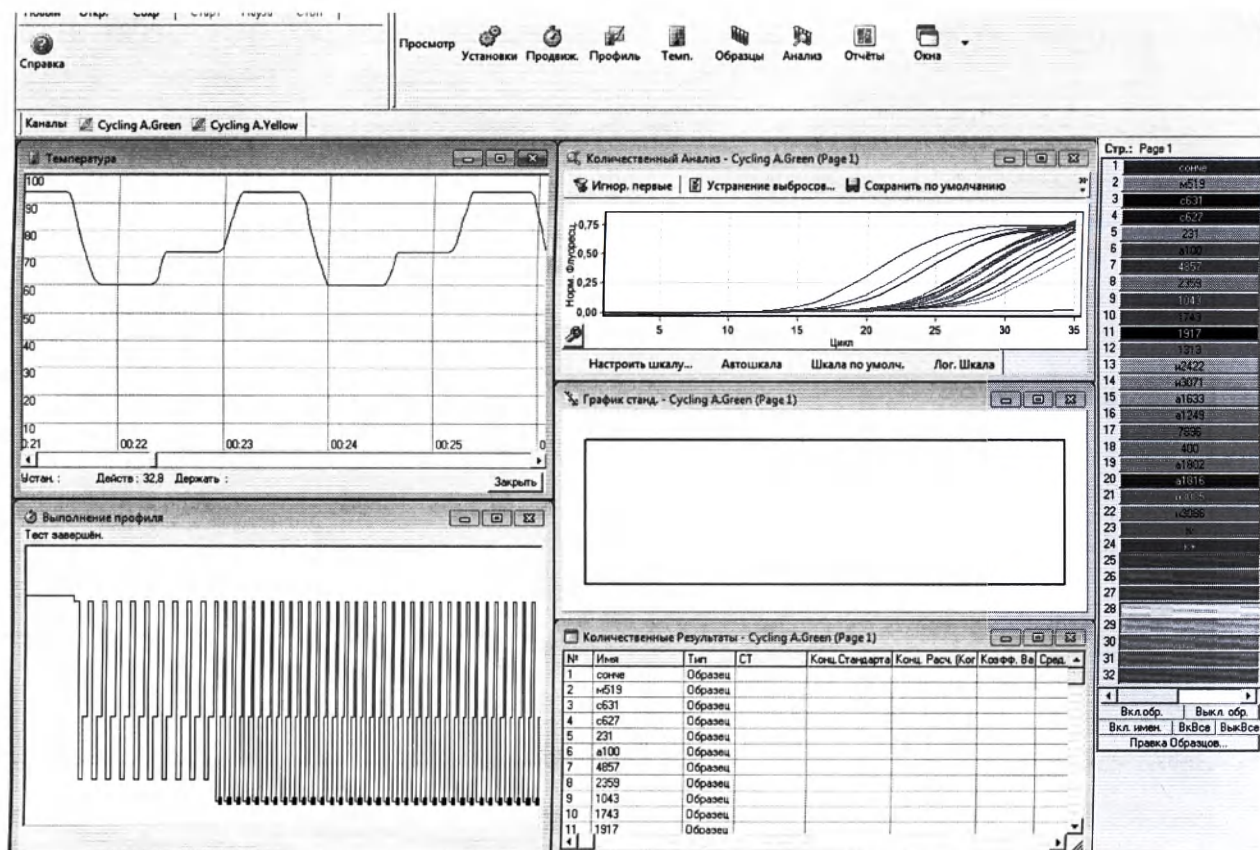
Показатели	FAM	JOE
Наименование мишени	PC-подвид	
Функция «Slope Correct»/«Коррек. уклона»	ilvN	AK38_1327
Функция «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов»	активна	активна
Значения Threshold/Порог	5 %	10 %
	0,05	0,05

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green (RG) с PC-вид и PC-подвид:

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» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
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) – 5 %.

Устранение выбросов

☒ Порог Фона - ПФ (NTC):

Процент от наибольшего изменения флуоресценции:

0% 15% 30%

5 % Образцы с изменением флуоресценции менее этого порога (относительно наибольшего изменения в любом из образцов), будут обозначены как отрицательные - ОТР(ПФ).

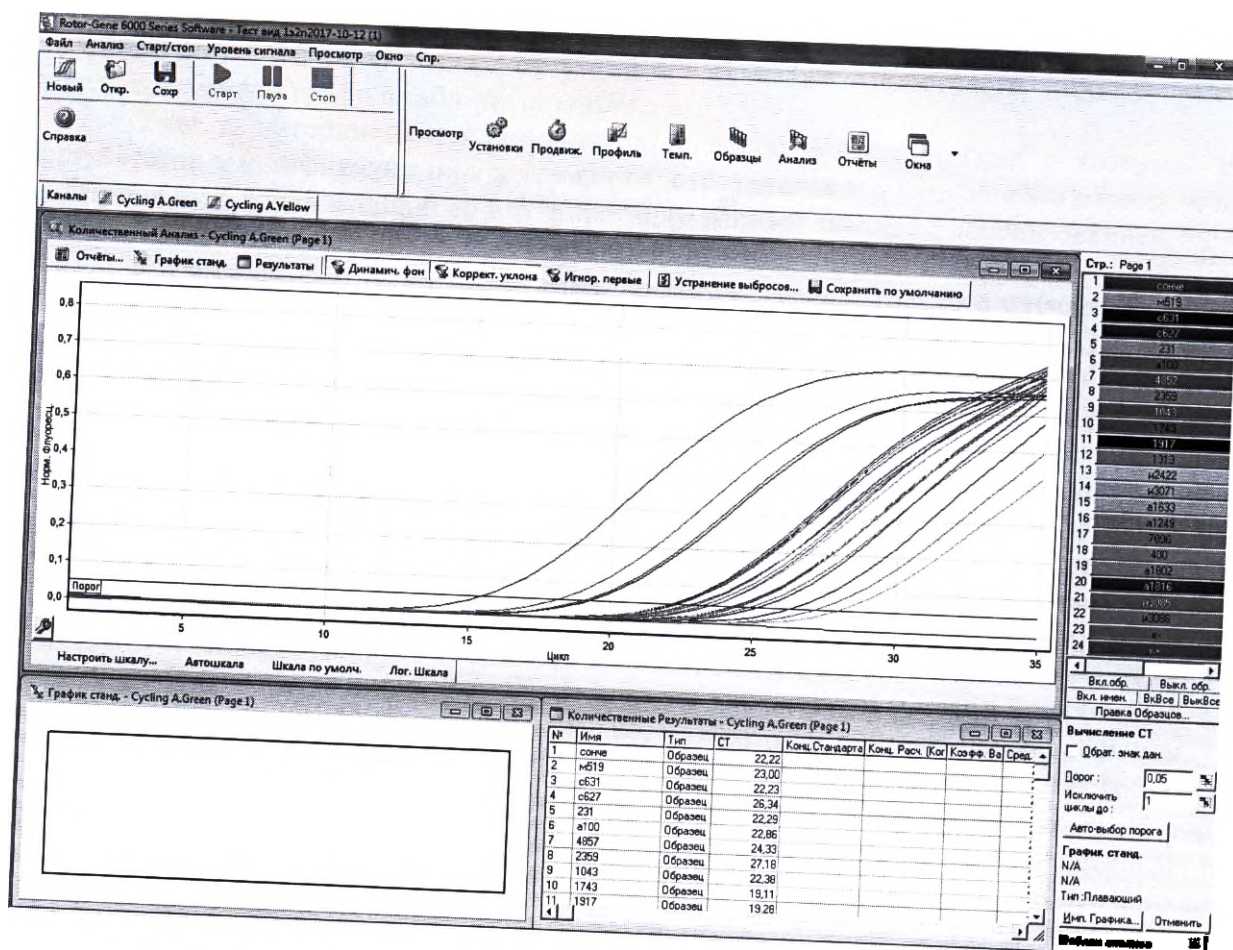
Порог Эффективности Реакции:

☐ активировать Только образцы которые имеют индивидуальную Эффективность реакции по крайней мере равную этому значению будут показаны после нормализации.

Порог: 100 %

OK Отменить Спр.

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



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

Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (RG) с PC-подвид:

- Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
- Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
- В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
- 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).
- В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.
- В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,05.
- В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

7.4.5. Учет и интерпретация 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).

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 РС –вид и РС-подвид.

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

Пороговое значение Ct для положительных проб с РС-вид по каналу FAM (Green) составляет не более 26, пороговое значение Ct для положительных проб с РС-подвид по каналу FAM (Green) составляет не более 28, по каналу JOE (Yellow) – не более 25.

Если по каналу FAM с РС-вид выявлено значение Ct в пределах более 26 но менее 28, по каналу FAM с РС-подвид выявлено значение Ct в пределах более 28 но менее 31, по каналу JOE с РС-подвид выявлено значение Ct в пределах более 25 но менее 27 результат анализа считают невалидным, поскольку в пробе находится недостаточное количество ДНК чумного микроба для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование. Если при повторном исследовании получены значение (Ct) с РС-вид по каналу FAM (Green) не более 26, с РС-подвид по каналу FAM (Green) - не более 28, с РС-подвид по каналу JOE (Yellow) – не более 25, то результат считают положительным.

При повторном получении значений Ct по каналу FAM с РС-вид в пределах более 26 но менее 28, по каналу FAM с РС-подвид - в пределах более 28 но менее 31, по каналу JOE с РС-подвид - в пределах более 25 но менее 27 в случае исследования нативных проб осуществляют их исследование после обогащения, или проводят концентрирование материала путем центрифугирования. Анализ осуществляют с этапа выделения ДНК. При отсутствии повышения значений Ct результат считают отрицательным.

При повторном получении значений Ct по каналу FAM с РС-вид в пределах более 26 но менее 28, по каналу FAM с РС-подвид - в пределах более 28 но менее 31, по каналу JOE с РС-подвид - в пределах более 25 но менее 27 в случае исследования бактериальных суспензий чумного микроба анализ осуществляют еще раз, начиная с этапа выделения ДНК.

Контроли	Значения порогового цикла (Ct) по каналу		
	FAM/ Green	FAM/ Green	JOE/ Yellow
	РС-вид	РС-подвид	
К+	≤ 26	≤ 28	≤ 27
К-	—	—	—
ОКВ	—	—	—

Таблица интерпретации данных анализа с использованием РС –вид и РС-подвид

Таблица интерпретации данных анализа с использованием РС –вид и РС-подвид				
Пробы	Значения порогового цикла (Ct) по каналу			Результат анализа
	FAM/Green	FAM/Green	JOE/Yellow	
	<i>yihN</i>	<i>ilvN</i>	AK38_1327	
	РС-вид	РС-подвид		
Исследуемые пробы	< 26	—	<25	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> основного подвида
	< 26	<28	—	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> неосновного алтайского подвида
	< 26	<28	<25	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> неосновных (кроме алтайского) подвидов
	—	<28 или —	<25 или —	В пробе ДНК чумного микроба не обнаружена
	При значении Ct по одному или нескольким каналам			Результат невалидный. Недостаточно материала для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование, в том числе с использованием проб после обогащения, или провести концентрирование клеток в пробе.
	>26 – <28	>28 – <31	>25 – <27	

Пример интерпретации результатов

Пример интерпретации результатов анализа см. приложение 1.

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Транспортирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-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-подвид/алтай-РГФ» – ПЦР-смесь-вид, ПЦР-смесь-подвид, 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 набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» - 6 месяцев.

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

Условия эксплуатации набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – при температуре от 18 до 25 °С.

9. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-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

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



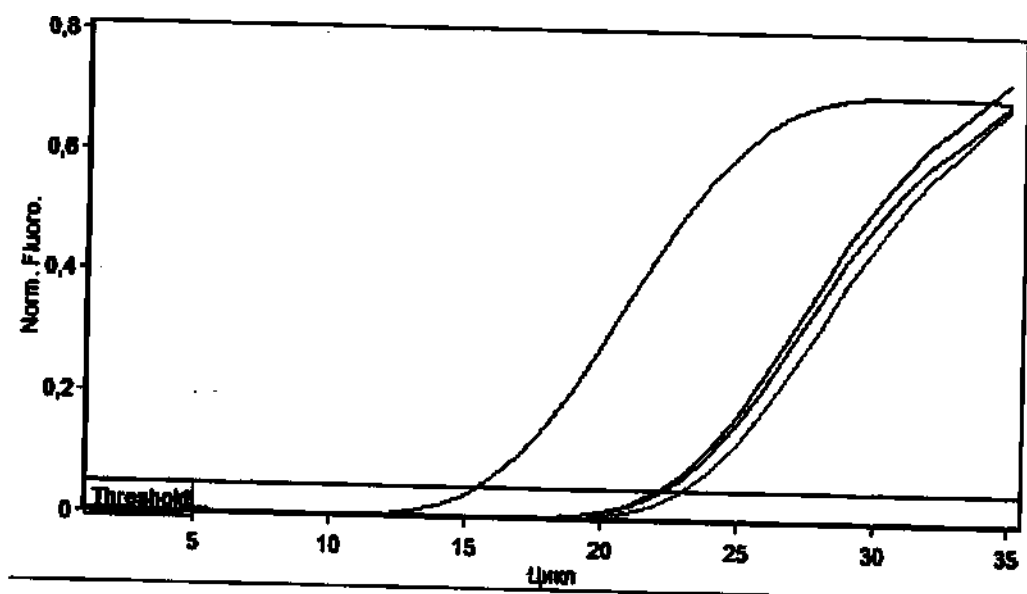
А.К. Никифоров

П.К. Варнавичус

Пример регистрации, учета и интерпретации результатов с использованием набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ»

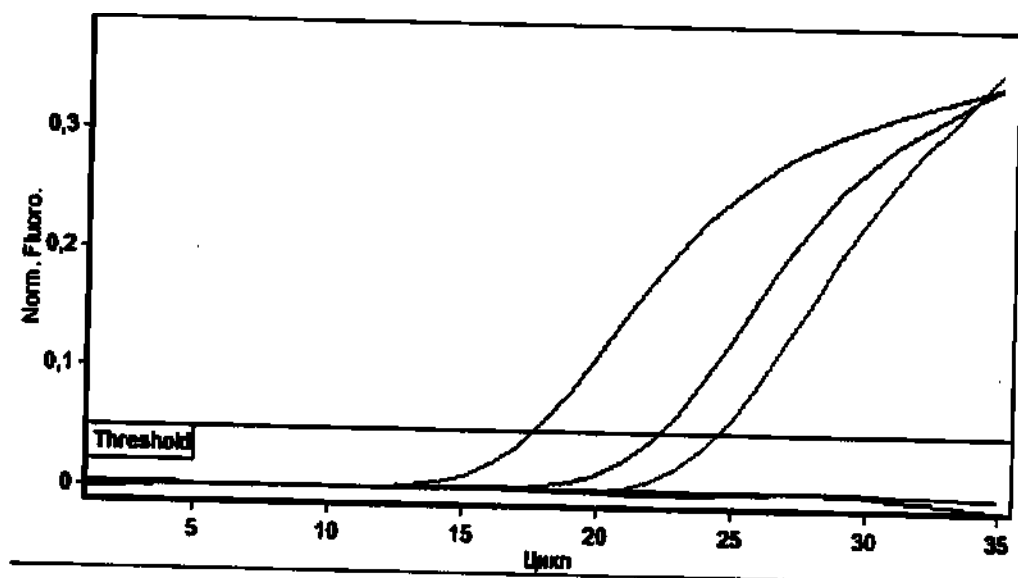
РС-вид

FAM/Green



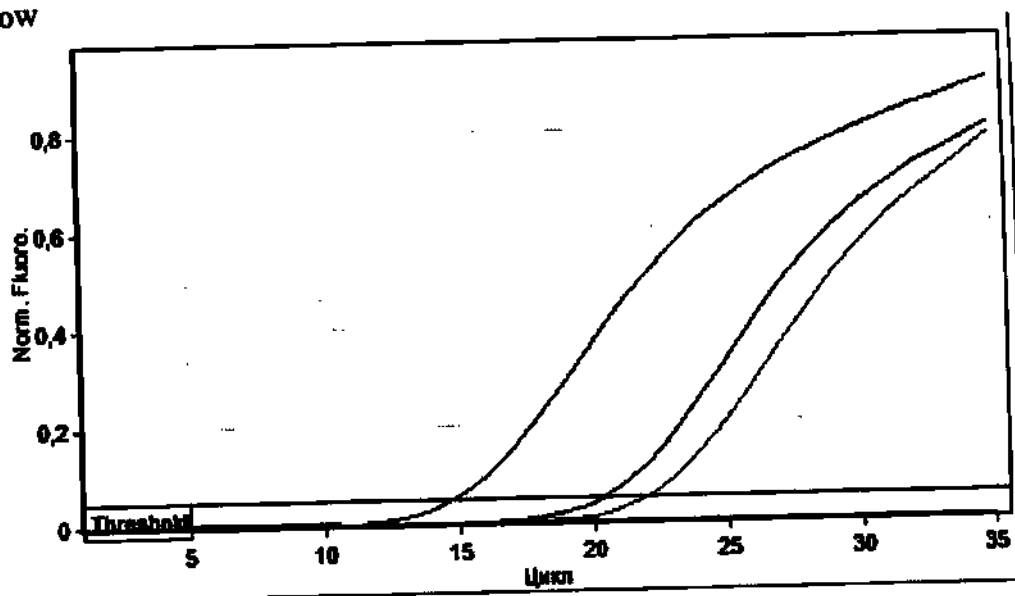
РС-подвид

FAM/Green



РС-подвид

JOE/Yellow



No.	Colour	Name	Type	Ct			Результат анализа
				FAM вид	FAM подвид	JOE подвид	
1	■	Проба 1	Unknown	22,22	NEG (NTC)	20,35	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> основного подвида
2	■	Проба 2	Unknown	22,38	22,32	NEG (NTC)	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> неосновного алтайского подвида
3	■	Проба 3	Unknown	23,03	24,51	21,99	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> неосновных (кроме алтайского) подвидов
4	■	OKB	Unknown	NEG (NTC)	NEG (NTC)	NEG (NTC)	Результаты подлежат учету
5	■	к-	Unknown	NEG (NTC)	NEG (NTC)	NEG (NTC)	Результаты подлежат учету
6	■	к+	Unknown	15,53	17,62	14,77	Результаты подлежат учету

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 23 ЛИСТОВ

«24» 06 2018 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.