

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.Кузубов



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации
ДНК возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции в
реальном времени (ОМ-Скрин-Чума-РВ) по ТУ 9398-012-46395995-2013»**

2015

риях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства обороны.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 5 реагентов.

№ п/п	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-Чума	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-Чума	сухое вещество белого цвета	2 мг	3 пробирки
4.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
5.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В	сухое вещество белого цвета	2 мг	1 пробирка

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках (лиофилизованная), РС-Чума, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимоллярная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, восемь олигонуклеотидных праймеров, четыре флуоресцентных зонда, фермент Таq ДНК-полимераза, синтетическая ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК), трегалоза.

Разбавитель РБ, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ПЦР-буфер, хлорид магния, глицерол, вода для ПЦР.

Положительный контрольный образец (лиофилизированный), ПКО-Чума расфасован в три пробирки из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованные в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: смесь трех рекомбинантных плазмид pGem-T, содержащих

встроенные специфические последовательности ДНК *Yersinia pestis*: фрагмент хромосомной нуклеотидной последовательности *hmsH*; фрагмент хромосомного гена, кодирующего метилтрансферазу (YPO2088), и специфический фрагмент нуклеотидной последовательности (YPPCP1.09c) видоспецифичной плазмиды pPCP1 (pPst) чумного микроба.

Раствор для разбавления ПКО, **ОКО**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ТЕ буфер.

Внутренний положительный контроль выделения, **ВПК-В** (лиофилизированный), расфасован в пробирки из полипропилена объемом 0,5 мл с закручивающейся крышкой, упакованные в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: рекомбинантная плазида pGem-T со встроенным специфическим фрагментом ДНК.

Примечание: ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 60 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 48 определений, включая контрольные образцы.

2.3 Метод исследования

Обнаружение специфических фрагментов нуклеиновых кислот *Y.pestis* основано на использовании метода мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени – ПЦР-РВ.

При амплификации методом ПЦР-РВ используются шесть олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих специфические фрагменты ДНК *Y.pestis*, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующие ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также четыре

флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени. Постановка ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), «CFX-96» («BioRad», США), или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси фрагмент хромосомной нуклеотидной последовательности *hmsH*, ассоциированной с высокой вирулентностью *Y.pestis* для животных и человека – по каналу **FAM**, видоспецифическую последовательность хромосомного гена (YPO2088), кодирующего метилтрансферазу чумного микроба – по каналу флуоресценции **ROX**, уникальный фрагмент нуклеотидной последовательности (YPPCP1.09с) видоспецифической плазмиды pPCP1 (pPst), несущей детерминанты патогенности возбудителя чумы – по каналу флуоресценции **R6G**, а также внутренний положительный контроль – по каналу флуоресценции **Cy5**.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит ДНК возбудителя чумы. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит ДНК возбудителя чумы.

2.4 Ограничения метода

В инфицированном материале ДНК *Yersinia pestis* может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20 %.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения ДНК или на этапе проведения реакции ПЦР-РВ.

Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР-РВ (п. 7.5 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность выделения ДНК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца и ПЦР-РВ (п. 7.5 настоящей инструкции).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность – не более $1,0 \cdot 10^3$ копий ДНК в миллилитре пробы (копий $\cdot \text{мл}^{-1}$). Данный показатель достижим при условии отбора для выделения ДНК аликвоты исходного материала (пробы) объемом не менее 100 мкл.

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов ДНК возбудителя чумы (11 заведомо положительных образцов), ДНК близкородственных микроорганизмов *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica*, а также ДНК гетерологичных микроорганизмов (10 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность - при исследовании 180 проб бактериальных суспензий культур микроорганизмов и 48 проб биологического материала и объектов окружающей среды (228 положительных проб) содержащих *Y. pestis* в концентрации $1,0 \cdot 10^3$ м.к./мл положительный результат получен в 228 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 98,5 % с достоверной вероятностью 90 %.

Диагностическая специфичность – при исследовании 228 положительных образцов, содержащих *Y.pestis* (*hmsH*⁺, *pPst*⁺), *Y.pestis* (*hmsH*, *pPst*⁺), *Y.pestis* (*hmsH*, *pPst*⁻), положительный результат получен во всех 228 случаях, при исследовании 60 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^3$ м.к./мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 60 случаях. Диагностическая специфичность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90%.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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», МУК 4.2.2940-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», МУ 3.1.3.2355-08 «Методические указания по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации».

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалиста с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА I-II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с

набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM,

R6G, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}}$ (№ 1 – 490нм/520нм, № 2 – 525нм/550нм, № 3 – 550нм/580нм, № 4 – 630нм/665нм), например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96».

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл и на 20-200 мкл;

штатив-карусель для данных пипеток.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);

микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903»);

штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;

штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ЗАО Синтол);

холодильник на 2-8 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

ТЕ-буфер (кат. номер В-014, ЗАО «Синтол»);

набор реагентов для выделения ДНК/РНК;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителем чумы, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Исследованию подлежат препараты нуклеиновых кислот, приготовленные (согласно МУК 4.2.2940-11 и МУ 3.1.3.2355-08) из следующего материала: содержимое бубона, содержимое язвы, мокроты, мазков со слизистой зева; крови, мочи; испражнений; спинномозговой жидкости и др.; секционного материала; микробных культур; проб, отобранных в ходе эпизоотологического обследования на территории природного очага чумы (дикие и синантропные грызуны, их трупы, блохи, клещи и другие эктопаразиты), а также проб из объектов окружающей среды и воздуха.

6.2 Процедура получения биологического материала

Все работы по забору проб клинического и секционного материала от людей и из объектов окружающей среды осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I- II групп патогенности (опасности)», 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», МУК 4.2.2940-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», МУ 3.1.3.2355-08 «Методические указания по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации».

6.2.1 Взятие материала от человека

Кровь у людей берут из локтевой вены в количестве 10 мл с помощью одноразовой иглы (диаметр 0,8-1,1 мм) и специальной вакуумной системы типа «Vacuett» с ЭДТА или цитратом натрия либо 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.

Мокроту забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и закручивающимися 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 М тризамещенного натрия цитрата), либо раствор «Муколизин» (Na_2HPO_4 0,0774 М, NaH_2PO_4 0,0226 М, бетаМЭ 0,094 М, 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 0,067 М фосфатным буфером (рН 6,8) до конечного объема 50 мл. Пробу центрифугируют в течение 10 мин при 9000 об·мин⁻¹. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. 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 закручивающейся крышкой и центрифугируют при 9000 об·мин⁻¹ в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Пунктат из бубона (везикул, пустул, карбункулов) берут шприцем емкостью не менее 5 мл. Кожу на участке, намеченном для прокола, обрабатывают 70 %-м спиртом, а затем смазывают 5 %-м раствором йода и вновь протирают 70 %-м спиртом. Иглу вводят с таким расчетом, чтобы ее

острие достигло центральной части бубона, после чего, оттянув до отказа поршень, медленно вынимают иглу. Из-за расположения экссудата в чумном бубоне между плотными тканями количество его, попадающее в шприц, как правило, незначительно и часто заполняет только просвет иглы. После извлечения иглы из бубона через нее набирают в шприц 0,5 мл стерильного питательного бульона pH 7,2, содержимое переносят в стерильную пробирку с закручивающейся пробкой. Бульон можно набрать в шприц и до начала пункции. В качестве метода, повышающего возможность выделения культуры чумного микроба, и в случае невозможности получить материал, в бубон вводят 0,3-0,5 мл стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида или питательного бульона. При вскрывшемся бубоне забирают отдельно материал из периферической плотной части и отделяемое свища. Обе пробы исследуют раздельно.

Перед взятием отделяемого язвы, везикулы, пустулы, карбункула или отторгнутого струпа прединъекционной дезинфицирующей салфеткой осторожно очищают кожу вокруг пораженного места, при необходимости стерильной марлевой салфеткой удаляют некротические массы, гной. Прокатывая тампон по раневой поверхности от центра к периферии в течение 5-10 с абсорбируют материал на тампон. Тампон с материалом помещают в стерильную пробирку или в транспортную среду. При использовании шприца иглу вводят у края везикулы (пустулы) и затем продвигают к середине. У карбункулов и язв пунктируют плотный край.

Отделяемое из зева забирают натошак или через 3-4 ч после еды. Аккуратно прижимая язык шпателем, вводят тампон между дужками миндалин и язычком (нельзя касаться тампоном губ, щек, языка) и собирают материал с задней поверхности глотки, миндалин и участков воспаления или изъязвления слизистой. Тампон с материалом помещают в стерильную пробирку или пробирку с транспортной или питательной средой.

У больных чумой с локализацией первичных бубонов в области головы и шеи дополнительно забирают на исследование слизистое отделяемое ротовой

полости и глотки стерильным тампоном.

6.2.2 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⁻¹. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого.

6.2.3 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 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций».

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 12000 об·мин⁻¹ в течение 2 мин для осветления пробы.

Клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96 %-го этанола, встряхивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют в течение 3-5 с при 2000 об·мин⁻¹ 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⁻¹. 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 закручивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 2 мин для осветления пробы. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку с закручивающейся крышкой.

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

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин при $5000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого.

6.3 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

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: сахароза 0,218 М, KH_2PO_4 0,0038 М, K_2HPO_4 0,0072 М, БСА 1 %. При необходимости длительного хране-

ния и (или) транспортирования, при отсутствии низкотемпературных холодильников, используют специальную транспортную среду ESP состава: саркозил 1 %, ЭДТА 0,05 М, проназа Е 1 мг·мл⁻¹. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при температуре от плюс 20 до плюс 30 °С в темном месте до 10 дней.

6.4 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие возбудителя чумы, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118 – 13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности (СП 1.2.036-95).

Клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10).

6.5 Обеззараживание проб

Обеззараживание материала проводят согласно методическим указаниям по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащем микроорганизмы I-IV групп патогенности (МУ 1.3.2569-09). К исследуемым образцам добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при 56 °С в течение 30 мин. Затем к 100 мкл образцов, обработанных мертиолятом натрия и разлитых в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий буфер на основе 6М гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

6.6 Выделение ДНК

Для выделения НК используют зарегистрированные наборы реагентов сообразно происхождению проб. Для достижения показателей чувствительности объем аликвоты исходного материала (пробы) должен составлять не менее 100 мкл. Полученный препарат НК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ».

Для определения возможной контаминации на этапе выделения ДНК в каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом включают отрицательный контроль выделения (ОКО-В), который анализируют далее в ПЦР-РВ.

Для определения эффективности выделения ДНК из исследуемого материала в каждую пробу на этапе ее подготовки к анализу добавляют внутренний положительный контроль выделения (**ВПК-В**) из состава набора реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ». Для его приготовления в пробирку с сухим содержимым **ВПК-В** вносят 200 мкл элюента из состава наборов реагентов для выделения, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Полученный раствор **ВПК-В** добавляют по 10 мкл во все пробирки с исследуемыми образцами после их обеззараживания и в пробирку с ОКО-В.

При применении на этапе пробоподготовки наборов производства ЗАО «Синтол» добавления **ВПК-В** для контроля выделения нуклеиновых кислот не требуется, поскольку он входит в состав лизирующего компонента.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления положительного контрольного образца

В пробирку с сухим содержимым **ПКО-Чума** из набора реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ» добавляют 200 мкл **ОКО**, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов **ПКО-Чума** допускается при температуре не выше минус 20 °С не более месяца.

7.2 Разведение препарата ДНК (при необходимости)

Для выявления и идентификации ДНК возбудителя чумы необходимо внести в реакцию 20 мкл препарата ДНК. В случае необходимости, раствор препарата ДНК разводят с помощью ТЕ-буфера.

7.3 Проведение ПЦР

Расход каждого реагента

На одну постановку ПЦР-РВ (без учета повторов) требуются:

1 пробирка – для ОКО;

1 пробирка – для ОКО-В;

1 пробирка – для ПКО;

необходимое количество пробирок по числу исследуемых образцов.

На каждый анализ расходуется:

20 мкл **ПКО-Чума**;

20 мкл **ОКО**.

7.3.1 Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводится в один этап:

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;

- вводят согласно таблице 1 в диалоговый интерфейс программы амплификатора параметры температурно-временного режима ПЦР-РВ и вводят красители **FAM, ROX, R6G** и **Cy5**;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °С – 300 секунд	1
2	60 °С – 50 секунд Считывание сигнала флуоресценции	50
3	95 °С – 15 секунд	

- вводят сведения об образцах по соответствующему красителю (при использовании прибора «АНК32 (32М, 48)» ввод сведений об образцах возможен

после запуска программы амплификации) и активируют прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации;

- набор реагентов извлекают из холодильника, **РБ, ОКО** перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;

- устанавливают необходимое количество микропробирок с реакционной смесью **РС-Чума** в штатив (количество микропробирок соответствует числу исследуемых проб и контрольных образцов: **ПКО, ОКО, ОКО-В**) и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке, либо на крышке пробирки (в зависимости от прибора);

- открывают крышки микропробирок и вносят в них по 15 мкл **РБ**;

- используя наконечники с аэрозольным барьером последовательно вносят в микропробирки согласно их маркировке по 20 мкл **ОКО, ОКО-В** и исследуемых образцов, в необходимой повторности*, закрывают крышки данных микропробирок.

- вносят в микропробирки с маркировкой **ПКО** по 20 мкл **ПКО-Чума**, закрывают крышки данных микропробирок.

- перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹ Помещают микропробирки в прибор для ПЦР-РВ в соответствии с таблицей 2 и прикрывают крышки микропробирок.

Таблица 2. Порядок исследования образцов

№ ячейки	Образец
1	ПКО
2	ОКО
3	ОКО-В
4	исследуемый образец 1
5	исследуемый образец 1
6	исследуемый образец 2
7	исследуемый образец 2
8	

- закрывают крышку прибора, запускают реакцию ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора (расчетное время анализа составляет около 2-х часов).

*Примечание: каждый образец рекомендуется анализировать в двух повторях.

7.4 Процедура измерения результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96» или эквивалентных им (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции (регистрация роста сигнала) означает любую величину порогового цикла C_t менее 50. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается программой прибора, например, как величина порогового цикла ($C_t \geq 50$ в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы «BioRad») и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналам **FAM**, **ROX** и **R6G** относительно отрицательного контроля свидетельствует о наличии специфических фрагментов ДНК *Y.pestis* в данной микропробирке.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** в случае отсутствия роста сигнала по каналам **FAM**, **ROX** и **R6G** свидетельствует об успешном прохождении реакции ПЦР-РВ и подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК *Y.pestis* в данной микропробирке. При этом наличие сигнала флуоресценции в данной микропробирке по каналу **Cy5** с пороговым циклом C_t менее 31,0 в сравнении с сигналом флуоресценции по каналу **Cy5** ОКО ($C_t \geq 35,0$), также свидетельствует об успешном выделении ДНК.

7.5 Учет результатов реакции

7.5.1. Оценка амплификации ВПК-В

Регистрация в пробирке с ОКО-В роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** с пороговым циклом C_t менее 31,0 свидетельствует об успешном выделении ДНК внутреннего положительного контроля в пробирке с ОКО-В (рисунок 1).

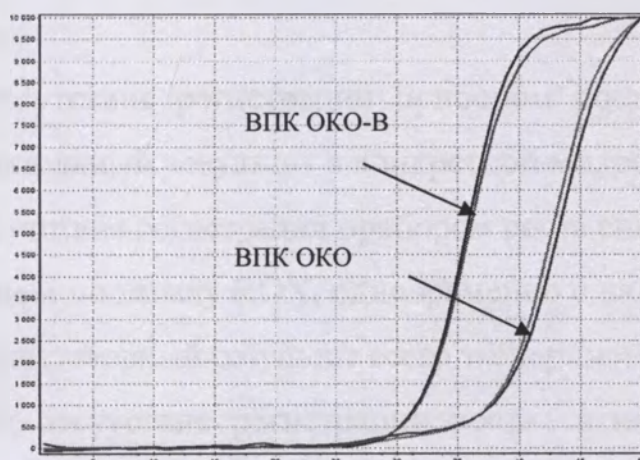


Рисунок 1 – Результат реакции ПЦР-РВ (канал **Cy5**) для пробирок с ОКО-В, в которые было добавлено 10 мкл раствора ВПК-В, а затем проведено выделение (кинетические кривые ВПК ОКО-В) и пробирок с ОКО (содержащих ВПК), в которые не добавлялась ДНК ВПК-В и с которыми не проводили выделение (кинетические кривые ВПК ОКО)

Рост сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** в пробирках с исследуемыми образцами в случае отсутствия роста сигнала флуоресценции по другим каналам подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК возбудителя чумы.

Регистрация в пробирках с исследуемыми образцами роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5*** с пороговым циклом C_t менее 31,0 свидетельствует об успешном выделении ДНК в пробирках с исследуемыми образцами.

*Допускается отсутствие регистрации роста сигнала по каналу **Cy5** в пробирках, где отмечена рост сигнала по каналам **FAM, R6G, ROX** с пороговым циклом реакции менее 30,0.

7.5.2 Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с ОКО (ОКО-В) по любому из каналов **FAM**, **R6G** и **ROX** (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации прибором роста сигнала в пробирке с ПКО по любому из каналов **FAM**, **R6G**, **ROX** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации прибором роста сигнала по каналу **Cy5*** (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке);
- в случае отсутствия регистрации прибором роста сигнала в пробирке с **исследуемым образцом** по каналу **ROX**, одновременно с наличием роста сигнала по каналу **R6G** (недостовверный результат всего эксперимента).

*Допускается отсутствие регистрации роста сигнала по каналу **Cy5** в пробирках, где отмечена рост сигнала по каналам **FAM**, **R6G**, **ROX** с пороговым циклом реакции менее 30,0.

7.5.3 Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с ОКО (ОКО-В) по каналам **FAM**, **ROX** и **R6G** одновременно с наличием роста сигнала по каналу **Cy5**;
- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с ПКО по каналам **FAM**, **ROX** и **R6G** с любой величиной порогового цикла C_t ;
- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с **исследуемым образцом** по каналу **Cy5*** с любой величиной порогового цикла при регистрации роста сигнала флуоресценции по каналам **FAM**, **ROX** или **R6G**. А так же $C_t \leq 31,0$ по каналу **Cy5*** при отсутствии сигнала флуоресценции по каналам **FAM**, **ROX** и **R6G**.

Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с **исследуемым образцом** одновременно по каналам **FAM**, **R6G** и **ROX** свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК высоковирулентного эпи-

демически значимого штамма возбудителя чумы. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с **исследуемым образцом** по каналам **FAM** и **ROX**, в случае отсутствия роста сигнала по каналу **R6G**, свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК возбудителя чумы со сниженной эпидемической активностью. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с **исследуемым образцом** по каналу **ROX**, в случае отсутствия роста сигнала по каналу **FAM**, свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК авирулентного штамма чумного микроба. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с **исследуемым образцом** по каналу **FAM**, в случае отсутствия роста сигнала по каналу **ROX**, свидетельствует об отсутствии в образце специфических фрагментов ДНК возбудителя чумы. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

*Примечание: допускается отсутствие регистрации сигнала по каналу **Sy5** в пробирках, где отмечена флуоресценция по каналам **FAM**, **ROX** и **R6G** с пороговым циклом реакции менее 30,0.

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице 3.

Таблица 3 – Интерпретация результатов анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ»

Образец	Результат ПЦР по каналу флуоресценции				Интерпретация результата
	FAM	R6G	ROX	Cy5	
	<i>hmsH</i>	pPCP1 (pPst)	YPO2088	ВПК	
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев					
ПКО	–	–	–	–	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
ОКО-В	Положительный результат по любому из каналов			любой	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения ДНК
ОКО					Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы					
проба	–	–	–	–	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
	любой	+	–	любой	Недостовверный результат. Необходимо повторить анализ данной пробы
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов					
ПКО	+	+	+	любой	Набор реагентов специфичен в отношении ДНК возбудителя чумы
ОКО	–	–	–	+	Контаминация отсутствует
ОКО-В	–	–	–	Ct≤31,0	Контаминация отсутствует Набор для выделения ДНК работоспособен
проба	+	+	+	любой	В пробе содержится ДНК высоковирулентного, эпидемически значимого штамма возбудителя чумы
	+	–	+	любой	В пробе содержится ДНК возбудителя чумы, со сниженной эпидемической активностью
	–	любой	+	любой	В пробе содержится ДНК авирулентного штамма чумного микроба
	любой	–	–	Ct≤31,0	В пробе отсутствует ДНК возбудителя чумы

8 РАСЧЕТЫ

8.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например программа АНК_Shell версия 33 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М», «АНК-48» или Bio-Rad CFX Manager 2.0 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 9398-012-46395995-2013 – в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

9.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-012-46395995-2013 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до 20 °С.

9.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Срок годности разведенных препаратов ПКО-Чума не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

9.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ве-
тошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые за-
крывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предна-
значенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей
инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упа-
ковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы,
по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных
характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и экс-
плуатационной документации, в течение установленного срока годности
(12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и
применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОМ-Скрин-Чума-РВ» направ-
лять на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тими-
рязевская, 42, тел. (495) 984-69-93, факс. (499) 977-74-55
E.mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по при-
менению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании,
фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и меди-
цинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направ-
вить сообщение на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» по адресу, ука-
занному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую органи-
зацию в соответствии с действующим законодательством.

Директор ФКУЗ «Российский
научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора
академик РАН, д.м.н., профессор



В.В. Кутырев

Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 25 листов

Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.В. Кузубов

