

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

«20» марта 2015 г.



А.Кузубов

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации ДНК
возбудителей бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции в
реальном времени (ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ)
по ТУ 9398-015-46395995-2013»

2015

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ) по ТУ 9398-015-46395995-2013».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) ДНК возбудителей бруцеллеза (*Brucella spp.*) в биологическом материале – в крови, сыворотке, пунктатах лимфатических узлов, синовиальной жидкости, костном мозге, моче, желчи; материале от животных (околоплодные воды, плацента, выделения из половых и родовых путей); молоке, мясе и других пищевых продуктах животного происхождения, в пробах из объектов окружающей среды – пробах почвы, воды, смывах с различных поверхностей, а также в культурах микроорганизмов методом ПЦР-РВ.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфической патологии (бруцеллез) при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА), в объектах окружающей среды; как ускоренного предварительного теста при выполнении биологического метода исследования и идентификации подозрительных культур; для эпидемиологического мониторинга.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика бруцеллеза, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, в лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии и противочумных учреждениях Роспотребнадзора, в эпидемиологических службах, а также в стационарных и мобильных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства обороны.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

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

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 6 реагентов.

№ п/п	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-Бру1	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
2	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-Бру2	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
3	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	2 пробирки
4	Положительный контрольный образец, ПКО-Бру	сухое вещество белого цвета	2 мг	3 пробирки
5	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1,5 мл	1 пробирка
6	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В	сухое вещество белого цвета	2 мг	1 пробирка

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках (лиофилизованная), РС-Бру1, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимоллярная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, пять олигонуклеотидных праймеров, четыре флуоресцентных зонда, фермент Таq ДНК-полимераза, синтетическая ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК), трегалоза. Также данная смесь включает IRD14 ROX.

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках (лиофилизованная), РС-Бру2, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимоллярная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, шесть олигонуклеотидных праймеров, четыре флуоресцентных зонда, фермент Таq ДНК-полимераза, синтетическая ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК), трегалоза.

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

Положительный контрольный образец (лиофилизированный), **ПКО-Бру** расфасован в три пробирки из полипропилена объемом 0,5 мл с закручивающейся крышкой, упакованные в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: смесь пяти рекомбинантных плазмид pGem-T, содержащих встроенные специфические последовательности ДНК: фрагмент родоспецифичного для *Brucella spp.* гена *abc*, кодирующего ABC транспортер АТФ-связывающего белка YJJK; фрагмент гена *abc*, содержащий видоспецифичный в отношении *Brucella abortus* SNP(A); фрагмент гена ундекапренил-фосфат α-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, специфичный для *Brucella suis*; фрагмент гена, кодирующего белок BCAN_B0380, специфичный в отношении *Brucella canis*; фрагмент гена *cusw*, содержащий видоспецифичный в отношении *Brucella melitensis* SNP(G).

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 пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с закручивающейся крышкой, упакованную 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 °C. 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 *Brucella spp.* основано на использовании метода мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени – ПЦР-РВ.

При амплификации методом ПЦР-РВ всего в двух реакционных смесях используются 9 олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих специфические фрагменты ДНК *Brucella spp.*, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующие ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также семь флуоресцентных зондов. 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-Бруцеллез-РВ» позволяет: одновременно выявлять в первой реакционной смеси РС-Бру1 - специфичный для всех микроорганизмов рода *Brucella* фрагмент гена *abc*, кодирующего ABC-транспортёр АТФ-связывающего белка YJJK – по каналу флуоресценции FAM, фрагмент гена *abc*, содержащий видоспецифичный в отношении *Brucella abortus* SNP(A) – по каналу флуоресценции R6G, фрагмент гена ундекапренил-фосфат α -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, специфичный для *Brucella suis* – по каналу ROX, а также внутренний положительный контроль – по каналу флуоресценции Cy5; во второй реакционной смеси РС-Бру2 - специфичный для всех микроорганизмов рода *Brucella* фрагмент гена *abc*, кодирующего ABC

транспортер АТФ-связывающего белка YJJK – по каналу флуоресценции FAM, фрагмент гена, кодирующего белок BCAN_B0380, специфичный в отношении *Brucella canis* – по каналу флуоресценции R6G, фрагмент гена, содержащий видоспецифичный в отношении *Brucella melitensis* SNP(G) – по каналу ROX, а также внутренний положительный контроль – по каналу флуоресценции Cy5.

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

2.4 Ограничения метода

В инфицированном материале ДНК возбудителей бруцеллеза 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·мл⁻¹). Данный показатель достигим 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 НК музейных штаммов *Br.abortus*, *Br.suis*, *Br.melitensis*, *Br.ovis*, *Br.canis*, *Br.neotomae*, (14 заведомо положительных образцов), а также НК гетерологичных видов микроорганизмов (6 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 154 проб бактериальных суспензий культур микроорганизмов, 32 пробы биологического материала, 16 проб материала от животных и продуктов животного происхождения, 16 проб из объектов окружающей среды (218 положительных проб), содержащих возбудитель бруцеллеза видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae* в концентрации $1,0 \cdot 10^3$ м.к./мл положительный результат получен в 218 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 %.

Диагностическая специфичность – при исследовании 52 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (*Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*,

Enterobacter, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*) в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^3$ м.к./мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 52 случаях. Диагностическая специфичность – не менее 96 % 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», СП 3.1.7.2613-10 «Профилактика бруцеллеза», МУК 4.2.3010-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

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 бруцеллеза, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: кровь, сыворотка, пунктаты лимфатических узлов, синовиальная жидкость, костный мозг, моча, желчь, материал от животных (околоплодные воды, плацента, выделения из половых и родовых путей), молоко, мясо и другие пищевые продукты животного происхождения, а также в пробы из объектов окружающей среды – пробы почвы, воды, смывы с различных поверхностей и т.д.

6.2 Процедура получения биологического материала

Все работы по забору проб клинического и секционного материала от людей, из сырья животного происхождения, продовольственного сырья 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», СП 3.1.7.2613-10 «Профилактика бруцеллеза», МУК 4.2.3010-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

6.2.1 Взятие материала от человека

Кровь у больного берут натошак из локтевой вены в количестве 5-10 мл, соблюдая правила асептики, шприцем или с использованием вакуумной системы типа «Vakurette®» с активатором сыворотки. Шприцем кровь переносят в стерильную пробирку. Для получения сыворотки крови и предотвращения гемолиза пробирку с кровью оставляют при комнатной температуре в скошенном положении до образования сгустка. Полученную сыворотку отбирают в пластиковую пробирку, герметично закрывают и направляют в лабораторию для исследования.

Пункцию лимфатического узла проводят обычно без местной анестезии простой инъекционной иглой, надетой на 10-граммовый шприц. Полученный материал идет на исследование в ПЦР.

Для забора синовиальной жидкости стерильную пункционную иглу вводят в полость сустава и аспирируют небольшое количество его содержимого. Наиболее часто отбор синовиальной жидкости производят из коленного сустава.

Костный мозг получают путем пункции грудины шприцем с короткой и несколько затупленной иглой. Полученный костный мозг (в количестве нескольких капель) засевают в пробирку на питательные среды (см. посевы крови).

Спинномозговую жидкость отбирают после пункции поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков в количестве 0,1-0,3 мл и засевают на питательные среды (см. посевы крови).

При исследовании мочи собирают ее среднюю порцию (10-20 мл) в специальный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой.

Пробы желчи (среднюю порцию) собирают при зондировании в процедурном кабинете. Над пламенем спиртовки открывают пробирку для сбора материала, полученную желчь (10-12 мл) помещают в одноразовую стерильную пробирку с завинчивающейся пробкой. При использовании стерильной стеклянной пробирки, закрытой газопроницаемой пробкой, после

наполнения емкости обжигают горлышко и пробку в пламени спиртовки, закрывают пробирку. При использовании пробирки с газопроницаемой пробкой пробу доставляют в лабораторию в строго вертикальном положении, чтобы не замочить пробку желчью.

6.2.2 Взятие материала от животных

Органы лабораторных 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 (масса/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 хлорида.

6.3 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

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 или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды следующего состава: сахараза 0,218 М, KH_2PO_4 0,0038 М, K_2HPO_4 0,0072 М, БСА 1 %. При необходимости длительного хранения 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 возбудителей бруцеллеза, 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 6 М 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-Бруцеллез-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-Бруцеллез-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-Бру из набора реагентов «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ» добавляют 200 мкл ОКО, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов ПКО-Бру допускается при температуре не выше минус 20 °С не более месяца.

7.2 Разведение препарата ДНК (при необходимости)

Для выявления ДНК и идентификации возбудителей бруцеллеза 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:

2 пробирки – для ОКО (РС-Бру1 + РС-Бру2);

2 пробирки – для ОКО-В (РС-Бру1 + РС-Бру2);

2 пробирки – для ПКО (РС-Бру1 + РС-Бру2);

необходимое количество пробирок РС-Бру1 и РС-Бру2 по числу исследуемых образцов.

На каждый анализ расходуется:

40 мкл ПКО-Бру (РС-Бру1 + РС-Бру2);

40 мкл ОКО(РС-Бру1 + РС-Бру2).

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, R6G, ROX и Cy5;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °С – 300 секунд	1
2	63 °С – 40 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-Бру1 и реакционной смесью РС-Бру2 в штатив (количество микропробирок для каждой реакционной смеси 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-Бру, закрывают крышки данных микропробирок.

- перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Помещают микропробирки в прибор для ПЦР-РВ в соответствии с таблицей 2 и прикатывают крышки микропробирок.

Таблица 2. Порядок исследования образцов

№ ячейки	Образец
1	ОКО (РС-Бру1)
2	ОКО-В (РС-Бру1)
3	ПКО (РС-Бру1)
4	исследуемый образец 1 (РС-Бру1)
5	исследуемый образец 1 (РС-Бру1)
8	...
...	ОКО (РС-Бру2)
...	ОКО-В (РС-Бру2)
...	ПКО (РС-Бру2)
...	исследуемый образец 1 (РС-Бру2)
...	исследуемый образец 1 (РС-Бру2)
...	...

*Примечание: каждый образец рекомендуется анализировать в двух повторях.

- 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).

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, R6G и ROX относительно отрицательного контроля свидетельствует о наличии специфических фрагментов ДНК возбудителей бруцеллеза в данной микропробирке.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу Cy5 в случае отсутствия сигнала по каналам FAM, R6G и ROX свидетельствует об успешном прохождении реакции ПЦР-РВ и подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК возбудителей бруцеллеза 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 ($C_t \geq 35$), также свидетельствует об успешном выделении ДНК.

7.5 Учет результатов реакции

7.5.1. Оценка амплификации ВПК-В

Регистрация в пробирках 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 (рисунок 1).

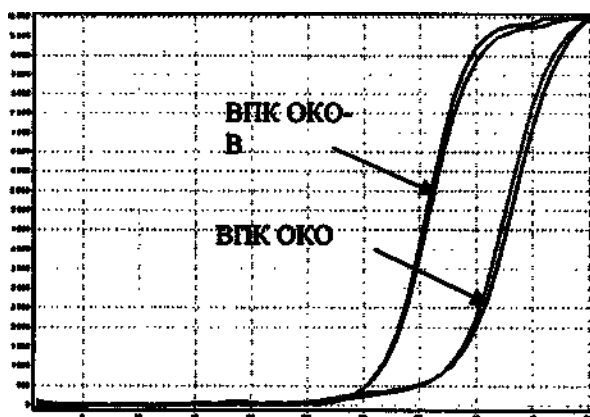


Рисунок 1 – Результат реакции ПЦР-РВ (канал Cy5) для пробирок с ОКО-В, в которые было добавлено 10 мкл раствора ВПК-В, а затем проведено выделение (кинетические кривые ВПК ОКО-В) и пробирок с ОКО (содержащих ВПК), в которые не добавлялась ДНК ВПК-В и с которыми не проводили выделение (кинетические кривые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

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

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 Ct при этом не имеет значения;

- в случае отсутствия регистрации прибором в пробирке с ПКО роста сигнала по любому из каналов FAM, R6G и ROX (ложноотрицательный 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.**

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала прибором в пробирке с исследуемым образцом по каналу FAM при условии регистрации роста сигнала по каналу R6G и/или ROX;

- в случае отсутствия регистрации прибором сигнала по каналу Cy5** (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

7.6.3 Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с ОКО (ОКО-В) по каналам FAM, R6G и ROX одновременно с наличием сигнала по каналу Cy5;

- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с ПКО по каналам FAM, R6G и ROX 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, R6G. А так же $C_t \leq 31,0$ по каналу Cy5** при отсутствии роста сигнала флуоресценции по каналам FAM, ROX, R6G.

Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналу FAM одновременно в микропробирках РС-Бру1 и РС-Бру2 с исследуемым образцом при отсутствии сигналов по каналам R6G и ROX свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК микроорганизмов рода *Brucella*.

Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G в микропробирке РС-Бру1 с исследуемым образцом свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК *Brucella abortus*.

Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналам FAM и ROX в микропробирке РС-Бру1 с исследуемым образцом свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК *Brucella suis*.

Регистрация роста сигналов флуоресценции по каналам FAM, R6G и ROX в микропробирке РС-Бру1 с исследуемым образцом свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК *Brucella abortus* и *Brucella suis*.

Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналам FAM и ROX в микропробирке РС-Бру2 с исследуемым образцом свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК *Brucella canis*.

Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G в микропробирке РС-Бру2 с исследуемым образцом свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК *Brucella melitensis*.

Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналам FAM, R6G и ROX в микропробирке РС-Бру2 с исследуемым образцом свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК *Brucella canis* и *Brucella melitensis*.

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице 3.

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

Образец	Результат ПЦР по каналу Флуоресценции РС-Бру1				Результат ПЦР по каналу флуоресценции РС-Бру2				Интерпретация результата
	FAM	R6G	ROX	Cy5	FAM	R6G	ROX	Cy5	
	<i>Brucella spp.</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Brucella suis</i>	ВПК	<i>Brucella spp.</i>	<i>Brucella canis</i>	<i>Brucella melitensis</i>	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	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	–	+	любой	любой	Недостовверный результат
		любой	+			любой	+		
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов									
ПКО	+	+	+	любой	+	+	+	любой	Набор реагентов специфичен в отношении ДНК возбудителей бруцеллеза
ОКО	–	–	–	+	–	–	–	+	Контаминация отсутствует
ОКО-В	–	–	–	Ct≤1,0	–	–	–	Ct≤1,0	Контаминация отсутствует Набор для выделения ДНК работоспособен

Продолжение таблицы 3

Образец	Результат ПЦР по каналу Флуоресценции РС-Бру1				Результат ПЦР по каналу флуоресценции РС-Бру2				Интерпретация результата
	FAM	R6G	ROX	Cy5	FAM	R6G	ROX	Cy5	
	<i>Brucella spp.</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Brucella suis</i>	ВПК	<i>Brucella spp.</i>	<i>Brucella canis</i>	<i>Brucella melitensis</i>	ВПК	
Распределение результатов									
проба	+	+	—	любой	любой	—	—	любой	В пробе содержится ДНК <i>Br.abortus</i>
	+	—	+			—	—		В пробе содержится ДНК <i>Br.suis</i>
	+	+	+			—	—		В пробе содержится ДНК <i>Br.abortus</i> и <i>Br.suis</i>
	любой	—	—		+	+	—		В пробе содержится ДНК <i>Br.canis</i>
		—	—		+	—	+		В пробе содержится ДНК <i>Br.melitensis</i>
		—	—		+	+	+		В пробе содержится ДНК <i>Br.canis</i> и <i>Br.melitensis</i>
	+	+	—		+	+	—		В пробе содержится ДНК <i>Br.abortus</i> и <i>Br.canis</i>
	+	—	+		+	—	+		В пробе содержится ДНК <i>Br.suis</i> и <i>Br.melitensis</i>
	+	+	—		+	—	+		В пробе содержится ДНК <i>Br.abortus</i> и <i>Br.melitensis</i>
	+	—	+		+	+	—		В пробе содержится ДНК <i>Br.suis</i> и <i>Br.canis</i>
	+	+	+		+	+	—		В пробе содержится ДНК <i>Br.abortus</i> , <i>Br.suis</i> , <i>Br.canis</i>
	+	+	+		+	+	+		В пробе содержится ДНК <i>Br.abortus</i> , <i>Br.suis</i> , <i>Br.canis</i> , <i>Br.melitensis</i>
	+	—	—		+	—	—		В пробе содержится ДНК <i>Brucella spp.</i> , но отсутствует ДНК <i>Br.abortus</i> , <i>Br.suis</i> , <i>Br.canis</i> , <i>Br.melitensis</i>
	—	—	—	Ct≤31,0	—	—	—	Ct≤31,0	В пробе отсутствует ДНК <i>Brucella spp.</i>

При получении положительного результата анализа по каналам R6G либо ROX в случае постановки реакции на приборах серии АНК имеется дополнительный уровень контроля анализа. Приборы серии АНК дают возможность просмотра сырых данных накопления сигнала флуоресценции, поэтому в ходе и по завершению ПЦР-РВ имеется возможность отличить РС-Бру1 от РС-Бру2 с помощью специального контрольного компонента IRD14ROX. С этой целью просматривают сырые данные накопления сигнала флуоресценции первых 10 циклов реакции по каналу ROX. Приращение сигнала флуоресценции при температуре 95 °С относительно 60 °С должно составлять не менее 1000 единиц и многократно превышать приращение сигнала в пробирках не содержащих IRD14ROX. Пример интерпретации приведен на рисунке 2.

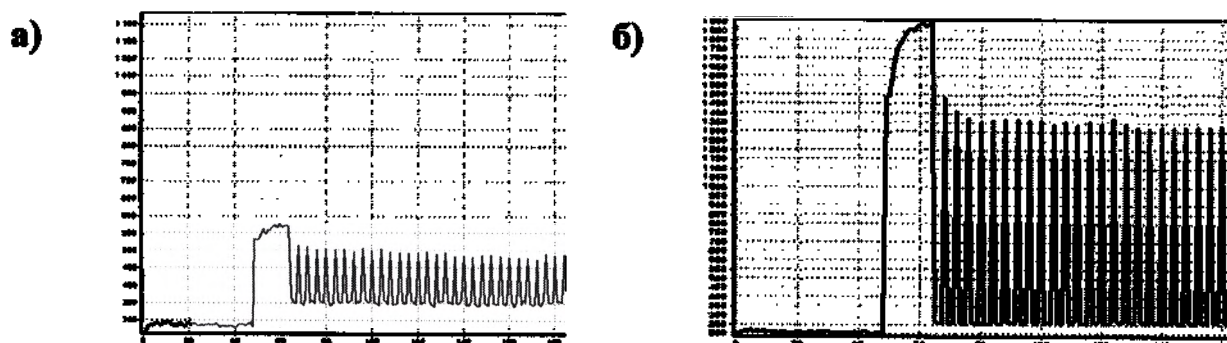


Рисунок 2 – Приращение сигнала флуоресценции
при температуре 95 °С относительно 60 °С

а) сигнал в пробирке с РС-Бру2, б) сигнал в пробирке с РС-Бру1

8 РАСЧЕТЫ

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 9398-015-46395995-2013 – 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-Бруцеллез-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-015-46395995-2013 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-Бру не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

9.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное 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 упаковки, 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 эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ» направлять на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 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 применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

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



В.В. Кутырев



Прочито, пронумеровано,
проброшюровано 26 листов

Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.В. Кузубов

