

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 10.02.09 № 992-17/09

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального

государственного

учреждения

науки «Центральный научно-

исследовательский институт

эпидемиологии» Федеральной

службы по надзору в сфере защиты

прав потребителей и благополучия

человека


В.И. Покровский

«07» ноября 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. в биологическом

материале и культурах микроорганизмов методом

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL»

Набор реагентов выпускается в двух вариантах.

Вариант FEP.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3** и **4** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **2** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 (ТУ 9398-003-01897593-2006) – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость*	15	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость*	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК бактерий *Brucella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FER/FRT <i>Brucella</i> spp. раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Brucella</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

* При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Вариант FER Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FER; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FER; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ОКО	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного	1,6	1 пробирка
ВКО STI-704	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК бактерий *Brucella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Brucella</i> spp. раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Brucella</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ОКО	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного	1,6	1 пробирка
ВКО STI-704	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL»** предназначен для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. (*B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae*) в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Рекомендуется ознакомиться с МУ 3.1.7.1189-03 «ПРОФИЛАКТИКА И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

/ **VER** 07.11.08 /стр. 4 из 23

БРУЦЕЛЛЕЗА ЛЮДЕЙ», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ 30.01.2003.

Вариант FEP. Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведение ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала (ТУ 9398-003-01897593-2006) производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT. Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведения ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Форма комплектации 2 предназначена для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения анализа используется следующий материал:

Материал от людей:

- цельная периферическая кровь забирается в пробирку с 3 % ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови.
- пунктат из лимфоузлов после взятия помещают в стерильную одноразовую пробирку со 100 мкл транспортной среды (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) или стерильного 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида

(физиологического раствора).

- синовиальная жидкость помещают в стерильную одноразовую пробирку.

Материал от животных:

- кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови.
- молоко отбирают в объеме 10-20 мл в стерильную посуду.
- содержимое брюшной полости и желудка, селезенка, печень абортированного плода.
- плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных.
- содержимое бурс, гигром.
- в случае убоя животных для исследования отбирают парные лимфатические узлы с обеих сторон туши целиком (парааортальные, надвыменные, паховые, тазовые) и кусочки паренхиматозных органов (печень, селезенка), от самцов с признаками орхита или эпидидимита отбирают семенники с придатками.

Культуры микроорганизмов.

- культуры в жидких средах использовать без предварительной подготовки.
- подозрительные на *Brucella* spp. колонии ресуспендировать в 0,5 мл физиологического раствора.

Хранить материал до проведения исследования можно в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, 1 мес при температуре не выше минус 16 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала.

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием стерильных ступок, пестиков, инструментов (ножниц, пинцетов,

скальпелей), дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и наконечников с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т и утилизироваться в соответствии с вышеуказанными документами. Ступки, пестики и инструменты должны обрабатываться согласно СП 1.3. 1285–03.

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, синовиальной жидкости, пунктаты из лимфоузлов, содержимое бурс и гигром, культуры микроорганизмов используют для выделения ДНК без предварительной подготовки после стадии обеззараживания (см. раздел «**Обеззараживание материала**»).

Пробы паренхиматозных органов, семенников, плодовых оболочек, плаценты (каждую отдельно) размером 1x1x1см, а лимфатические узлы целиком, гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков добавляют равный объем стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают. Образовавшуюся смесь отстаивают при температуре от 20 до 25 °С в течение 5 мин, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой (или наконечником с аэрозольным барьером) в пробирки на 1,5 мл, проводят обеззараживание (см. раздел «**Обеззараживание материала**») и 0,1 мл используют для выделения ДНК. Нижнюю фазу вместе с пробиркой утилизируют в соответствии с требованиями СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Молоко в объеме 10 мл (при необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора), обеззараживают (см. раздел «**Обеззараживание материала**») и центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости

и 0,1 мл суспензии используют для выделения ДНК.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛА.

Проводят согласно МУ 3.5.5.1034-01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

Обработка мертиолятом натрия.

1. В образцы биологического материала и культуры микроорганизмов (при необходимости после предварительной подготовки см. пункт **«Подготовка исследуемого материала»**) добавить 0,1 % натрия мертиолята (разведение 1:1000) до конечной концентрации 0,01 % (разведение 1:10000) и прогревают при температуре (56 ± 1) °С в течение 30 мин. Далее в работе использовать по 100 мкл проб.
2. При работе с подозрительными культурами обработанные мертиолятом бактериальные культуры по 1 мл отдельными дозаторами перенести в пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировать при 12000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удалить в емкость с дезинфицирующим раствором, осадок ресуспендировать в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида и использовать далее в работе.
3. Лизирующий раствор из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
4. В каждую пробирку со 100 мкл обеззараженного исследуемого материала внести по 300 мкл лизирующего раствора и инкубировать в течение 15 мин при температуре 65 °С.

Дальнейшие исследования проб проводить как с обеззараженным материалом по порядку процедур, описанных в разделе «Выделение ДНК из проб».

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. **Необходимо строго соблюдать СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп**

- патогенности (опасности)».
2. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
 3. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности».
 4. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
 5. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
 6. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

**Для выделения ДНК из исследуемого материала
требуются:**

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс

- об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
4. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
 5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
 6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
 7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
 8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
 9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
 10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
 11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
 13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

1. **Вариант FEP:** амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия или эквивалентный), для микропробирок 0,2 мл (например, «Gradient Palm Cyclor», «Corbett Research», Австралия или эквивалентный). Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия) или эквивалентный.
2. **Вариант FRT:** амплификатор «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или эквивалентный.
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
7. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).

Объем пробы, необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.

Порядок работы.

1. Подготовить **отрицательный контроль выделения ДНК (ОК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести **300 мкл лизирующего раствора** и **100 мкл ОК** – отрицательного контрольного образца.
2. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку с пробами (см. раздел «Обеззараживание материала»), включая **ОК**, по **10 мкл ВКО STI-704**.
3. Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть 5 мин при температуре 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), то необходимо центрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.
4. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе

- на 5 мин.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 6. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 7. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 8. Повторить отмывку раствором для отмывки 2, следуя п. 7, удалить надосадочную жидкость полностью.
 9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
 10. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
 11. Процентрифугировать пробирки при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы - 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при температуре 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Вариант FEP.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.**
3. Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
4. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** на поверхность воска внести **17 мкл ПЦР-смеси-Фон**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР.**

Б. Проведение амплификации.

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации:**
 - а) **отрицательный контроль (К-) –** вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
 - б) **положительный контроль (К+) –** внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.**

3. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1.

Программа амплификации ДНК *Brucella* spp.

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):				Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Uno-2» («Biometra»), «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research»)					
«GeneAmp PCR System 2400» («Applied Biosystems»), «Терцик» (точный алгоритм регулирования) («ДНК-технология»)				«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»)					
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		93 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	2 мин	1	93 °С	2 мин	1	95 °С	2 мин	1
2	95 °С	10 с	10	93 °С	10 с	10	95 °С	25 с	10
	65 °С	25 с		65 °С	25 с		65 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	25 с	
3	95 °С	10 с	35	93 °С	10 с	35	95 °С	25 с	35
	56 °С	25 с		56 °С	25 с		56 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	25 с	
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	хранение	

4. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции.

В. Детекция с помощью флуоресцентного ПЦР детектора «АЛА-1/4».

Установка параметров теста «Brucella».

1. Запустить программу «ALA_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать «Настройки» → «Тест».
3. Нажать кнопку «Новый» (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста «Brucella», нажать кнопку ОК.
5. В группе параметров «Каналы» отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (FAM, HEX), в группе «ВКО» отметить канал, который используется для внутреннего контроля (FAM).

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

6. В полях «п-» и «п+» установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каналу для детекции специфической ДНК:
HEX: «п-» = 2.5, «п+» = 3.0;
В поле «ВКО/фон» задать пороговое значение отношения сигнала по каналу для детекции ВКО к фону:
«ВКО/фон» = 2.5.
7. В группе параметров «Уровень фона» установить значения флуоресценции, допустимые для фоновых пробирок:
FAM: = 100;
HEX: = 50.
8. Ввести названия мишеней в блок параметров «Привязка каналов» и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу «Добавить», при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце «Привязка каналов» выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:
Brucella= HEX
9. Блокировать функцию «Доверительный интервал», установив в поле «Доверительный интервал», значение 555 %.
10. Нажать кнопку «Сохранить».

Измерение флуоресцентного сигнала.

1. Включить прибор и запустить программу «ALA_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Для этого в главном меню выбрать «Протокол» → «Создать новый» или «Открыть», чтобы открыть созданный ранее протокол.
3. В окне протокола необходимо выбрать тип используемого ротора 36 x 0,5 или 48 x 0,2, ввести номер протокола, выбрать нужный тест («Brucella») в меню-вкладке «Тест» и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке «Образец»).
4. Обозначить образцы, которые являются фоновыми для данной группы образцов, как «фон» (используя сочетание клавиш «Ctrl» и «F»). В качестве образцов, обозначенных

- «ФОН» использовать пробирки с образцами «ФОН».
5. Закрывать окно редактирования протокола, нажав на кнопку «Exit» в верхнем левом углу панели. Протокол сохранить.
 6. Поставить пробирки в ячейки ротора в соответствии с заданной последовательностью и запустить детекцию, выбрав в меню «Протокол» → «Детекция» или значок «Детекция по протоколу» на панели инструментов (вверху экрана).

Учет результатов.

1. Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы «ALA_1». Результаты в таблице представляются с помощью следующих обозначений:
«обнаружено» – положительный результат;
«не обнаружено» – отрицательный результат;
«сомнительно» – результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»);
«нд» – недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).
2. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации	
		канал FAM	канал HEX
«OK»	Выделение ДНК	ВКО+	«Brucella - не обнаружено»
«К-»	ПЦР	ВКО-	«Brucella - нд»
«К+»	ПЦР	ВКО-	«Brucella – обнаружено»

3. Образцы, для которых получен результат «нд» (кроме К-), требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если повторно получен результат «нд», требуется повторить

анализ образца, начиная с этапа выделения. Для образца «К-» результат «нд» является нормой.

4. Образцы, для которых получен результат «**сомнительно**», требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.
5. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
6. Если в отрицательном контроле (ОК или К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Вариант FRT.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.**

Б. Проведение амплификации.

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Brucella***.
 - в) **положительный контроль (ВК+)** – в подготовленные для ПЦР пробирки внести **10 мкл ПКО STI**.

В. Программирование амплификатора:

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором «Rotor-Gene» 6000- программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажать кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню «Advanced»/«Детальный мастер» и шаблон запуска эксперимента «Dual Labeled Probe»/«Hydrolysis probes»/«Флуоресцентные зонды (TaqMan)». Нажать кнопку «New»/«Новый».
3. Выбрать тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Поставить отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
4. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
5. Выбрать объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
6. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
7. В верхней части окна нажать кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
8. Задать следующие параметры эксперимента:
 1. Hold/Удерж. темп-ры 95 °C – 5 мин
 2. Cycling/Циклирование 95 °C – 10 с
65 °C – 25 с
72 °C -10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
 3. Cycling2/Циклирование2 95 °C – 10 с
56 °C – 25 с – Детекция
72 °C -10 с

Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.

4. Флюоресценцию измеряют при **56 °C** (во втором блоке циклирования) по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow**.
5. Нажать кнопку «ОК»/«Да».
9. В нижней части окна нажать кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.». В открывшемся окне нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых». Для обоих красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение **5**, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение **10**. В графе «Tube position/Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «*gain*»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрыть окно «Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала», нажав кнопку «**Close**»/«**Заккрыть**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».
10. Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**».
11. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку «**Edit samples**»/«**Правка образцов**» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации ВКО.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», «Show»/«Показать».

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

2. Отменить автоматический выбор Threshold/Порог.
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale видна кнопка Log scale).
4. В меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню основного окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) 0 %.
6. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0.1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct, которые должны быть не более 31 для исследуемых образцов и контролей.

Анализ результатов амплификации ДНК *Brucella*.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», «Show»/«Показать».
2. Отменить автоматический выбор Threshold/Порог.
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale видна кнопка Log scale).
4. В меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню основного окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) 10 %.
6. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» выставить Threshold/Порог = 0.1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты интерпретируются 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).

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 3).

Таблица 3.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Значение Ct по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
OK	Выделение ДНК	< 31	Нет значений
К-	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	Нет значений	< 33
ВК+	ПЦР	< 31	Нет значений

- Образец считают положительным**, если значение Ct на канале JOE/Yellow менее 33.
- Образец считают отрицательным**, если по каналу JOE/Yellow для него значение Ct отсутствует, а по каналу FAM/Green для него определено значение Ct, не превышающее 31.

Результаты не подлежат учету:

- Отсутствие положительного сигнала в пробах с положительными контролями ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
- Если значение Ct на канале JOE/Yellow больше 33, а значение Ct по каналу FAM/Green не превышает 31, требуется повторить ПЦР и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения Ct на канале JOE/Yellow менее 33.

3. Образцы, для которых отсутствует значение Ct как по каналу JOE/Yellow, так и по каналу FAM/Green, или получено значение Ct по каналу FAM/Green более 31 требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае, если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.
4. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля (на канале JOE/Yellow) и для отрицательного контроля ПЦР (ДНК-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсосов на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.


Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.-FL*» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-39-39, факс (495) 305-54-23) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Руководитель Производства
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

 Родионова Е.Н.

Директор ФГУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института «Микроб»
Роспотребнадзора

 Кутырев В.В.

Руководитель приемочных технических
и медицинских испытаний
Зав. лабораторией препаратов против чумы
и других особо опасных инфекций
ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора

 Саяпина Л.В.