



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора

Сытырев В.В.
« 20 » г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ (ГЕНТУЛ – ИНДИКАЦИЯ - РЭФ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя туляремии методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (ГенТул – индикация - РЭФ), далее - набор реагентов «ГенТул – индикация - РЭФ», предназначен для выявления ДНК возбудителя туляремии в клиническом, биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. Набор реагентов может быть использован в учреждениях, имеющих Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности.

4. ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК возбудителя туляремии методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов основано на амплификации фрагмента *iglBC* генов *Francisella tularensis* размером 268 п.н.

Проведение анализа включает три основных этапа: выделение ДНК из проб клинического материала, амплификация участка ДНК возбудителя туляремии, регистрация образовавшихся ПЦР-продуктов (ампликонов) в агарозном геле после проведения электрофореза и его окраски бромидом этидия.

Амплификация фрагмента ДНК происходит в буферном растворе за счет праймеров, комплементарных последовательности *iglBC* генов туляремиального микроба, смеси нуклеотидов (дНТФ), фермента Taq ДНК-полимеразы в течение 35-40 циклов, состоящих из: денатурации при 95 °С, отжига праймеров при 60 °С, достройки комплементарной цепи при 72 °С. Все компоненты, за исключением фермента, содержатся в ПЦР-смеси-1 и ПЦР-смеси-РЭФ.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

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

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-1	Смесь праймеров, дНТФ и натрия азиды, сухая, в виде белого осадка; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок
ПЦР-смесь-РЭФ	прозрачная фиолетовая жидкость, содержащая Трис-НСl; калия хлорид; магния хлорид; Tween-20, глицерин, бромфеноловый синий натриевая соль	0,6	1 пробирка
Растворитель	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой H ₂ O, свободную от нуклеаз	0,6	1 пробирка
Таq ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,012	1 пробирка
ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl; Na ₂ -ЭДТА	5,0	2 пробирки
Минеральное масло	бесцветная вязкая жидкость, представляющая собой минеральное масло легкое белое, парафиновое	1	2 пробирки
ПКО ДНК <i>F. tularensis</i>	препарат ДНК <i>F. tularensis</i> , сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	3 пробирки

Набор реагентов «ГенТул - индикация - РЭФ» рассчитан на 60 определений с учетом контрольных образцов.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ*:

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор Терцик	Амплификатор Терцик, «ДНК-технология», Россия
Ламинарный бокс биологической безопасности класс IIВ	Ламинарный бокс биологической безопасности класс II БАВп-«Ламинар-С-1,2», «Ламинарные системы», Россия
ПЦР-бокс	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» «Ламинарные системы», Россия
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-встряхиватель «ТЭТА-2», «Биоком», Россия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, Термо 24-15, «Биоком», Россия.
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга на 13400 об/мин "Mini Spin" "Eppendorf", Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский "ОМ-1" ОАО "Утес", Россия

Источник питания	Источник питания "Эльф-8" "ДНК-технология", Россия
Камера для горизонтального электрофореза	Камера для горизонтального электрофореза Sub Cell GT System "БиоРад", США
Гель-документирующая система	Гель-документирующая система Gel Doc 2000 "БиоРад", США
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
Набор электронных или механических дозаторов переменного объема	Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (0,5-10, 10-100 мкл, 100-1000 мкл), Eppendorf, Германия
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,6 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,6 мл, 10×20 мест, «Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 5×10 мест с увеличенным расстоянием между лунками, «Хеликон», Россия
Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 18°С	«Атлант», Россия
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Аxygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Аxygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Аxygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Аxygen», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Аxygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,6 мл	ФСЗ 2012/11892 «Аxygen», США
Одежда одноразовая медицинская из нетканого и полимерного материалов	РЗН 2013/668
Перчатки медицинские диагностические одноразовые. Часть 1. Спецификация на перчатки из каучукового латекса или раствора	ГОСТ Р 52239-2004

* Примечание: допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Условия хранения – ПЦР-смесь-1, ПЦР-смесь-РЭФ, Растворитель, ТЕ-буфер, ПКО ДНК *F. tularensis*, минеральное масло при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С, Таq ДНК-полимераза - при температуре от минус 16 до минус 20 °С. Срок годности - 9 месяцев.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Использование набора реагентов «ГенТул – индикация - РЭФ» с истекшим сроком годности недопустимо.

Работу проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.2569 - 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат:

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

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично завинчивающимися крышками в соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036 – 95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». После проведения предварительной обработки проб допускается их транспортировка при температуре от минус 16 до минус 20 °С в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

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

9.1. Подготовка проб чистых культур микроорганизмов. Из культур туляремиального микроба или подозрительных изолятов готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует 5×10^9 м.к./мл для *F. tularensis*. Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^3 м.к./мл.

9.2. Подготовка проб клинического материала:

9.2.1. Кровь

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

9.2.2. Мокрота

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

9.2.3. Промывные воды бронхов

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

9.2.4. Мазок из носоглотки

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

9.2.5. Пунктаты бубона, отделяемое язв

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

9.3. Подготовка проб биологического материала

9.3.1. Пробы органов лабораторных и диких животных

Органы лабораторных и диких животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки органов массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

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

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

Грушировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.3012-12 "Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней".

Блох помещают в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7-1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлористого и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром или стеклянной пипеткой переносят пробу в микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 2 мин для осветления пробы. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

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

9.3.3. Погадки хищных птиц, экскременты грызунов и хищников

Остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин при 5000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.4. Подготовка проб из объектов окружающей среды

9.4.1. Почва

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин при 5000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

9.4.2. Вода открытых водоемов

Пробы берутся в затененном месте, на глубине 10-20 см от поверхности стоячей или слабопроточной воды в объеме 100-200 мл в стерильные емкости объемом 200-250 мл с завинчивающейся крышкой. Из одной точки берут 2 пробы. Для концентрирования бактериальных клеток используют либо дробное центрифугирование, либо вакуумную фильтрацию.

Для дробного центрифугирования из пробы воды переносят по 35 мл в 3 (6) центрифужные пробирки с винтовой горловинной крышкой типа Falcon объемом 50 мл и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Осадок в каждой пробирке ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Из центрифужных пробирок переносят полученную суспензию в микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

Для вакуумной фильтрации используют стерильные фильтры с размером пор 0,45 мкм. В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный пластиковый пакет объемом 100 мл, содержащих 10 мл 0,9 % раствора натрия хлористого. Фильтр внутри пакета растирают вручную в течение 1 мин. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1,0 мл в микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-анализ состоит из следующих этапов: обеззараживание материала, выделение ДНК; амплификация, регистрация и учет результатов.

10.1. Обеззараживание материала:

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с МУ 1.3.2569 - 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV группы патогенности».

Дополнительно к исследуемым образцам готовят отрицательный контроль выделения (ОКВ). Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ТЕ-буфера.

К исследуемым образцам и ОКВ добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01%) с последующим прогреванием их при (56 ± 1) °С в течение 30 минут. Затем к 100 мкл образцов, обработанных мертиолятом натрия и разлитых в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий буфер на основе 6 моль гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубируют 15 минут при температуре (65 ± 1) °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

10.2. Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинизотиоцианата с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб В», «Рибо-преп» или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанному набору.

10.3. Проведение ПЦР – амплификация ДНК

10.3.1. Подготовка ПКО ДНК *F. tularensis*

Перед началом работы с набором готовят ПКО ДНК *F. tularensis*. Для этого в пробирку с сухим ПКО добавляют 100 мкл Растворителя, выдерживают при комнатной температуре в течение 20-30 с, тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5-7 с и центрифугируют при 3000-5000 об/мин

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

10.3.2. Подготовка реакционной смеси

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

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

Отбирают необходимое количество пробирок "ПЦР-смесь-1" из расчета, что одна пробирка рассчитана на 12 реакций. В пробирку добавляют 60 мкл Растворителя, выдерживают при комнатной температуре в течение 20-30 с, тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5-7 с и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки. Разведенную ПЦР-смесь-1 хранят при температуре плюс 4 °С не более 2 месяцев.

В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционную смесь из расчета, что на 1 реакцию необходимо:

Реагент	Объем, мкл
ПЦР-смесь-1	5
ПЦР-смесь-РЭФ	10
Taq ДНК-полимераза	0,2

Подготовленную смесь тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе.

10.3.3. Подготовка реакционных пробирок

Для проведения реакции в штатив отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,6 мл. Затем в пробирки вносят по 15 мкл подготовленной реакционной смеси (п. 10.3.2.). Во все пробирки сверху добавляют каплю минерального масла (15-20 мкл).

Затем в пробирки под масло вносят по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и ОКВ. В микропробирку с отрицательным контролем амплификации (К-) вносят 10 мкл ТЕ-буфера, в микропробирку с положительным контролем амплификации (К+) - 10 мкл ПКО ДНК *F. tularensis*.

10.3.4. Проведение термоциклирования

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер. Запускают на термоциклере программу (таблица). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), пробирки помещают в ячейки прибора, закрывают крышку и снимают программу с паузы.

Матричный режим	1 этап	2 этап	3 этап	4 этап	5 этап	6 этап
	95 °С - пауза	95 °С - 5 мин	95 °С - 40 с 62 °С - 40 с 72 °С - 40 с 5 циклов	95 °С - 30 с 60 °С - 30 с 72 °С - 30 с 30 циклов	72 °С - 5 мин	10 °С - хранение
Активный режим	1 этап	2 этап	3 этап	4 этап	5 этап	6 этап
	95 °С - пауза	95 °С - 5 мин	95 °С - 10 с 62 °С - 10 с 72 °С - 10 с 5 циклов	95 °С - 7 с 60 °С - 7 с 72 °С - 7 с 30 циклов	72 °С - 5 мин	10 °С - хранение

По окончании ПЦР реакционную смесь (продукты реакции) хранят при температуре от 2 °С до 8 °С.

11. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрацию результатов ПЦР осуществляют методом электрофореза в 1,7- 2 % агарозном геле с использованием коммерческих наборов «ЭФ», «Комплект №1 для электрофоретической детекции» и др. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанному наборам. Электрофорез проводят при градиенте напряжения 10 В/см в течение 25-30 мин.

12. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) электрофореграмме специфичных полос амплифицированной ДНК.

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

Наименование контроля	Амплификация фрагмента ДНК размером 268 п.н.
К +	+
К-	-
ОКВ	-

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей.

Пробы	Амплификация фрагмента ДНК размером 268 п.н.	Результат анализа
Исследуемые пробы	+	Положительный/ В пробе выявлена ДНК <i>F. tularensis</i>
	—	Отрицательный/ В пробе ДНК <i>F. tularensis</i> не обнаружена
	Выявляется полоса, не соответствующая фрагменту положительного контроля	Отрицательный/ В пробе ДНК <i>F. tularensis</i> не обнаружена

13. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

13.1. Аналитическая чувствительность.

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

13.2. Аналитическая специфичность.

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

13.3. Диагностическая чувствительность

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

13.4. Диагностическая специфичность

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

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

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

15. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «ГенТул - индикация – РЭФ» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46 Тел. (845-2) 51-59-65).

Зам. директора по экспериментальной и
производственной работе ФКУЗ
РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

А.К. Никифоров

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров



27 ИЮН 2015

Информация получена с официального сайта
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения
www.goszdravnadzor.gov.ru

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 10 ЛИСТОВ

« 22 » ИЮН 2019 г. I год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров



Информация получена с официального сайта

Федеральной службы по надзору в сфере здра

www.goszdravnadzor.gov.ru