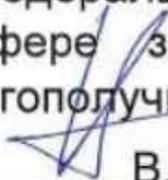


«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека




В.Г. Акимкин

« 06 »

июня

2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению тест-системы «БРУ-КОМ»
для выявления возбудителя бруцеллеза
методом полимеразной цепной реакции**

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «БРУ-КОМ» предназначена для выявления ДНК микроорганизмов рода *Brucella* в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК *Brucella* spp. основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с ДНК **экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-V)** и амплификации полученной ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит

нарастание интенсивности флуоресценции. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО-V	ДНК <i>Brucella</i> spp.

Тест-система содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, limit of detection, LOD)

Предел обнаружения был определен при использовании комплектов для экстракции ДНК «РИБО-преп», АмплиСенс® МАГНО-сорб-М, ДНК-сорб-В.

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Предел обнаружения, ГЭ/мл ¹
Тканевой материал	1x10 ³
Молоко	
Цельная кровь	
Содержимое бурс и гигром	
Культуры бактерий	

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Порядок отбора и подготовки проб».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность тест-системы доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов: *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter sputorum*,

¹ Количество геномных эквивалентов (геномов) микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца биологического материала.

Campylobacter fetus ssp. *venerealis*, *Campylobacter fetus* ssp. *fetus*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens* (типов А, В, С, D, Е), *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Histophilus somni*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Leptospira interrogans* *Pomona*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium avium* ssp. *avium*, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium intracellularis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma pneumonia*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma synovia*, *Neospora caninum*, *Pantoea agglomerans*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus* gr А, *Streptococcus* gr В, *Streptococcus* gr С, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bovine coronavirus*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 4*, *Bovine leukemia virus*, *Bovine parainfluenza-3 virus*, *Bovine respiratory syncytial virus*, *Bovine viral diarrhea virus*, *Canine adenovirus type 2*, *Canine distemper virus*, *Felid alphaherpesvirus 1*, *Porcine circovirus*, *Porcine epidemic diarrhea virus*, *Porcine parvovirus*, *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus*, *Transmissible gastroenteritis coronavirus*, *Porcine teschovirus*, *Rotavirus А*, *Sheeppox virus*, *Suid herpesvirus 1*, а также геномной ДНК лошади, лисы, КРС, собаки, козы, кошки, свиньи, барана и человека.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК животных неспецифических реакций выявлено не было.

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Условия повторяемости включали в себя тестирование в

одной лаборатории, одним оператором, с использованием одного оборудования. Условия воспроизводимости – тестирование разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий тест-системы. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава тест-системы и конфигурации анализа, которые позволяют исключить влияние потенциально интерферирующих веществ на результат анализа, полученный методом полимеразной цепной реакции:

- использование специфичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам выявляемых ДНК-мишеней;
- использование экзогенного внутреннего контроля (ВКО-V), добавляемого в каждый исследуемый образец на этапе экстракции ДНК, результат амплификации которого учитывается при оценке валидности результатов анализа.

Критерием отсутствия влияния потенциально интерферирующих веществ является валидный результат ПЦР-исследования.

Ввиду указанных особенностей состава тест-системы и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1 «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Brucella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации ДНК *Brucella* spp. с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Brucella</i> spp.	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
TaqF-UDG	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
K+ <i>Brucella</i> spp.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-V	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии, и методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с тест-системой только персонал, обученный молекулярно-биологическим методам диагностики и правилам работы в лаборатории в установленном порядке.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в

Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром². Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

² Для удаления надосадочной жидкости используются одноразовые наконечники без фильтра, если в процессе экстракции используется вакуумный отсасыватель.

- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия или аналогичный).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
3. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).
4. Иглы пункционные (например, Gebruder Martin GmbH & Co. KG («Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ»), Германия, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

5. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
11. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
12. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от

минус 24 до минус 16 °С.

14. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

16. Комплекты реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп», «ДНК-сорб-В», АмплиСенс® МАГНО-сорб-М.
17. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

18. Автоматическая станция для экстракции НК Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. («Ханчжоу Аошенг Инструментс Ко., Лтд.»), Китай, и другие, рекомендованные Изготовителем).
19. Комплект реагентов для экстракции ДНК АмплиСенс® МАГНО-сорб-М.
20. Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции в соответствии с рекомендациями ее производителя.

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

21. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»),

- Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
22. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 23. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
 24. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 25. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 26. Центрифуга-вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 27. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 28. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)) и другие, рекомендованные Изготовителем).
 29. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 30. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 31. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: цельная кровь, молоко, содержимое бурс, гигром, тканевой материал (лимфоузлы, селезенка, плацента, плодовые оболочки, содержимое брюшной полости и желудка, селезенка, легкие и печень абортированного плода), культуры бактерий.

ВНИМАНИЕ! Вид биологического материала для ПЦР-исследования определяет ветеринарный врач. При выборе биологического материала необходимо руководствоваться целью исследования, знаниями о патогенезе болезни и действующими регламентирующими документами.

Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования.

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Взятие цельной крови проводится в стерильные пробирки с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Молоко собирают в стерильный пластиковый контейнер в объеме 40-80 мл.

Для взятия содержимого бурс и гигром стерильным шприцем с иглой большого диаметра делают пункцию, отсасывают содержимое и переносят его в стерильную пробирку.

Тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты органов и тканей) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала (кроме образцов цельной крови):

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение длительного времени.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается хранение образцов цельной крови при температуре от 2 до 8 °С – не более 48 часов, замораживание цельной крови не допускается.

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

Цельная кровь, содержимое бурс и гигром, не требуют предварительной подготовки.

Пробы молока, тканевой материал и культуры бактерий требуют предварительной подготовки.

Пробы молока, в объеме 1 мл центрифугируют при 12-14 тыс g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость осторожно удаляют. Осадок ресуспендируют в 100 мкл (при экстракции «РИБО-преп», «ДНК-сорб-В») или в 200 мкл (при экстракции АмплиСенс® МАГНО-сорб-М) стерильного физиологического раствора и используют для экстракции ДНК.

Тканевой материал объемом 0,2-0,3 см³ (200-300 мкл) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят ~10 % (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин. Экстракцию ДНК проводят из верхней фазы суспензии. Допускается хранение гомогенатов при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 месяца.

Культуру бактерий разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации 10⁵–10⁶ м.т./мл используют для экстракции ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- а) «РИБО-преп» – из образцов молока, тканевого материала, и культур бактерий;
- б) «ДНК-сорб-В» – из образцов цельной крови, содержимого бурс/гигром, молока, тканевого материала, культур бактерий;
- в) АмплиСенс® МАГНО-сорб-М – из образцов цельной крови, молока, тканевого материала, культур бактерий

Порядок работы с комплектами реагентов смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-V**.

Очищенная ДНК может храниться:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 недели;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»:

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов АмплиСенс® МАГНО-сорб-М с использованием магнитных штативов вручную:

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов АмплиСенс® МАГНО-сорб-М с использованием автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

Экстракция нуклеиновых кислот проводится с помощью автоматической станции Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай) в соответствии с инструкцией по ее эксплуатации и с использованием соответствующего протокола экстракции.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Выбор пробирок для проведения ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые

наконечники с фильтрами.

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

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Brucella spp.* перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-FL *Brucella spp.*, ПЦР-буфер-С и TaqF-UDG из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-FL *Brucella spp.*;**
- **5 мкл ПЦР-буфера-С;**
- **0,5 мкл TaqF-UDG.**

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл реагента К–.**
- б) положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *Brucella spp.***
- в) отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.**

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью прибора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в Приложении 2.

Интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Результат ПЦР-исследования не является диагнозом. Оценка результатов исследования проводится ветеринарным врачом в соответствии с целью исследования и действующими регламентирующими документами.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 4

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК ВКО-V	ДНК <i>Brucella</i> spp.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (*Ct*).

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 5.

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	≤ 33	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 30	≤ 30

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 6

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
≤ 33	отсутствует	ДНК <i>Brucella</i> spp. НЕ обнаружена
определено или отсутствует	≤ 35	ДНК <i>Brucella</i> spp. обнаружена
отсутствует или > 33	определено > 35 или отсутствует	Невалидный*
≤ 33	определено > 35	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена ДНК *Brucella* spp. При получении отрицательного результата в повторной постановке считать, что в образце не обнаружена ДНК *Brucella* spp.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам FAM и JOE отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 5. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма. Необходимо повторить амплификацию таких образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (К+ *Brucella* spp., К–, ВКО-V, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL *Brucella* spp., ПЦР-буфер-С, TaqF-UDG) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Brucella* spp. хранить в защищенном от света месте.

Температура хранения вскрытых реагентов соответствует температуре хранения, указанной на этикетках для невскрытых реагентов.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «БРУ-КОМ» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – 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/Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

А. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene

- 6000 должно быть отмечено окошко **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/воска.**
- Нажать кнопку **Next/Далее.**
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля.**
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 7

Программа амплификации *Brucella spp.*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	-	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	10 с	-	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	-	40
	55	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	-	

- Нажать дважды кнопку **OK/Да.**
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции.** Для каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть.**
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт.**
- 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 роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец.**

Б. Анализ результатов

Анализ результатов по каналу FAM/Green:

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **St**.

Анализ результатов по каналу JOE/Yellow провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 8

Канал	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	0,05	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,1	включена	включена	10%

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

- Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
- В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
- В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Таблица 9

Программа амплификации *Brucella spp.*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	10 с	-	5
	60	25 с	-	
	72	25 с	-	
3	95	10 с	-	40
	55	25 с	FAM, HEX	
	72	25 с	-	

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.

1	95.0 C for 15:00
2	95.0 C for 0:10
	Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
3	60.0 C for 0:25
	Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
4	72.0 C for 0:25
	Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
5	GOTO 2 . . . 4 more times
6	95.0 C for 0:10
	Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
7	55.0 C for 0:25
	+ Plate Read
	Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
8	72.0 C for 0:25
	Slow Ramp Rate to 2.5 C per second
9	GOTO 6 . . . 39 more times

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

- Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor – New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

- Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Б. Анализ результатов

- Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными для анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
- В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
- Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия

(Threshold) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем, и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 5-10 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ в последнем цикле амплификации, при том, что график флуоресценции **K+** показывает характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Примечание – Чтобы выделить график образца «K+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Код партии



Дата изменения



Изготовитель



Дата изготовления



Знак обращения на рынке РФ



Осторожно!



Содержимого достаточно для проведения n- тестов



Использовать до



Предел температуры



Не допускать воздействия солнечного света