

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

ОКО - отрицательный контрольный образец;

ПКО – положительный контрольный образец;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

FAM, HEX, ROX, Cy5 –флуоресцентные красители для мечения олигонуклеотидов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии «MULTI-FLU сухой» по ТУ 21.20.23-296-78095326-2018 (далее набор реагентов «MULTI-FLU сухой») предназначен для одновременного качественного определения *in vitro* ДНК возбудителей чумы (*Yersinia pestis*), сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) и туляремии (*Francisella tularensis*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»

Набор реагентов «MULTI-FLU сухой» используется в клинической лабораторной диагностике и при эпидемиологическом мониторинге.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии «MULTI-FLU сухой» по ТУ 21.20.23-296-78095326-2018 состоит из 48 стрипованных микропробирок с сухой реакционной смесью, упакованных в один пакет, и трёх пробирок с реагентами.

Форма комплектации набора реагентов «MULTI-FLU сухой» предназначена для проведения полного ПЦР-исследования 48 образцов биологического материала, включая контроли.

Дополнительно для проведения ПЦР исследования необходимо использовать набор реагентов для экстракции ДНК (в комплект поставки не входят).

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот возбудителей инфекций основано на использовании метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В основе этого метода лежит изменение сигнала флуоресценции в ходе реакции. Это изменение происходит благодаря использованию специфического для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда, меченого флуоресцентной меткой, который, подобно праймеру, в ходе реакции комплементарно связывается с одной из цепей ампликона.

В одной пробирке проводятся одновременно 4 полимеразных цепных реакции. Происходит амплификация нуклеотидных последовательностей фрагментов: гена

метилтрансферазы хромосомы *Y. pestis* (регистрация по каналу ROX), гена элемента вставки *ISFtu5* хромосомы *F. tularensis* (регистрация по каналу HEX), гена *sspE* хромосомы *B. anthracis* (регистрация по каналу FAM) и нуклеотидной последовательности внутреннего положительного контроля (регистрация по каналу Cy5). Присутствие в образце ДНК одного из исследуемых микроорганизмов вызывает рост интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу амплификатора.

2.2.СОСТАВ

Таблица 1 – Комплект набора реагентов «MULTI-FLU сухой»

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
11.	Реакционная смесь сухая для проведения ПЦР (РС)	6 стрипов по 8 микропробирок с сухим веществом белого цвета в каждой;	48 микропробирок вместимостью 0,2 мл	1 пакет
2.	Реакционный буфер (РБ)	прозрачная бесцветная жидкость	1000 мкл в пробирке из полипропилена вместимостью 1,5 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец сухой (ПКО): ДНК <i>Y. pestis</i> , <i>F. tularensis</i> и <i>B. anthracis</i> ,	сухое вещество белого цвета	В пробирке из полипропилена вместимостью 0,5 мл	1 пробирка
4.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	200 мкл в пробирке из полипропилена вместимостью 0,5 мл	1 пробирка

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитические характеристики (подлинность, специфическая активность и чувствительность)

Контроль подлинности, специфической активности и чувствительности проводят методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

3.1.1. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Набор реагентов выявляет ДНК каждого возбудителя – *Y. pestis*, *B. anthracis* и *F. tularensis* в концентрации, соответствующей 1×10^4 кл/мл каждого возбудителя.

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил по взятию, транспортированию и хранению исследуемого материала, подготовке исследуемого материала к экстракции ДНК , указанных в разделах 6 и 7 настоящей Инструкции.

3.1.2. Специфическая активность.

Набор реагентов дает положительную реакцию во всех пробах, контаминированных одним из трёх видов возбудителя (*Y. pestis*, *F. tularensis*, *B. anthracis*) с соответствующими одному микроорганизму праймерами и зондом, и отрицательную с двумя остальными, гетерологичными данному возбудителю, парами праймеров и зондов, входящими в набор

Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании следующих штаммов микроорганизмов: *F. tularensis* subsp. *novicida* *B. suis*, *Y. pseudotuberculosis* *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*. При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК человека, ДНК клещей неспецифические реакции в редких случаях наблюдаются только с близкородственными сибиреязвенному микробу сапрофитными штаммами *B. cereus*.

Ген элемента вставки *ISFtu5* присутствует в геномах только эпидемически значимых подвидов туляремии микроба - *F. tularensis* (subsp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*) и отсутствует у подвида *F. tularensis* subsp. *novicida*, поэтому для штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* F 6168 (И-383) результат ПЦР также отрицательный.

3.2. Диагностические характеристики

При проведении клинических испытаний набора реагентов «MULTI-FLU сухой» в качестве образцов были исследованы растворы ДНК, выделенные из культур штаммов возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии, различных подвидов биоваров, содержащих разное количество плазмид, находящихся в коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболensk). Также были исследованы имитанты проб крови, мокроты, пунктата бубона и промывных вод бронхов (имитатор - 0,9 % раствор хлорида натрия), искусственно контаминированных штаммами микроорганизмов различной концентрации.

В каждом из образцов, контаминированных одним из трёх видов возбудителя набор показал положительную реакцию во всех пробах с соответствующими одному микроорганизму праймерами и зондом и отрицательную с двумя остальными, гетерологичными данному возбудителю, парами праймеров и зондов, входящими в набор. Используя графики оценки статистической достоверности результатов испытаний в зависимости от числа независимых опытов (75) при доверительной вероятности 90 %, определен показатель эффективности - диагностическая чувствительность (доля правильных положительных результатов) набора на уровне 94 %, диагностическая специфичность (доля правильных отрицательных результатов) – не менее 90 %.

Результаты исследования во всех случаях подтверждены использованием препарата сравнения - Набора реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и

туляремии методом ПЦР в режиме реального времени «MULTI-FLU» - ТУ 9398-157-78095326-2012, Рег. № РЗН 2013/1359, дата регистрации 23.01.2014.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 3

Все работы с материалом, подозрительным на заражение возбудителями чумы, сибирской язвы и туляремии, включая забор, транспортировку и подготовку материала для исследований, проводятся в соответствии с действующими нормативными актами, регламентирующими деятельность с возбудителями I-II групп патогенности (Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». МУ 1.3.2569-09).

При работе с набором необходимо всегда выполнять следующие требования:

Температура в помещении лаборатории должна быть от 20 до 28°C, относительная влажность - от 15 до 75 %.

Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).

Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Работы, связанные с высоким риском образования аэрозоля (центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, вскрытие объектов с зараженным материалом и другие), проводят в отдельных боксовых помещениях или боксах биологической безопасности III класса. После первичной обработки и обеззараживания материал в маркированных одноразовых микроцентрифужных пробирках объемом 1,5-2 мл с закрытой крышкой передается в зону экстракции ДНК, а затем в зону амплификации и детекции.

Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса!

Набор реагентов «MULTI-FLU сухой» готов к применению.

Применять набор строго по назначению.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).

Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Не использовать набор реагентов 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.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Канцерогенный эффект отсутствует. Мутагенное действие отсутствует. Репродуктивная токсичность отсутствует.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Для проведения ПЦР в режиме реального времени требуется:

- бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, « БАВ-ПЦР « Ламинар-С », ЗАО « Ламинарные системы », Россия, или аналогичный);
- микроцентрифуга-вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный);
- микроцентрифуга для стрипов;
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 и более независимых каналов флуоресцентной детекции (ROX, HEX, FAM, Cy5) диапазон температур от 0 до 100 °C) например, Real-Time CFX96 Touch Bio-Rad Laboratories Inc., США, РУ ФЗС 2008/03399 от 21.06.2016 г
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2, 0,5 и 1,5 мл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- 1 % раствор мертиолята натрия;
- набор для экстракции ДНК из биологического материала, разрешенный к применению
- отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки;
- штативы для наконечников, микропробирок на 0,2, 0,5 и 1,5 мл;
- холодильник на 2-8 °C и на минус 18-20 °C;
- емкость для сброса наконечников;

– комплект средств для обработки рабочего места.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Показания и противопоказания к применению набора реагентов «MULTI-FLU сухой».

Образцами для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого биологического материала.

Материалом для исследования служат:

- суспензии чистых культур исследуемых микробов или подозрительных изолятов; - бактериологический материал (кровь, мокрота, пунктат бубона и другие виды образцов биологического материала от больных с диагнозом, не исключающим по клиническим проявлениям чуму, сибирскую язву или туляремию: различные пневмонии, лимфадениты с повышенной температурой, сепсис различной этиологии). *Противопоказания для забора материала отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлён по медицинским показаниям.*

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 (опасности)», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», СП 1.2.036 – 95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 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 до минус 20 °С в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

6.1. Чистые культуры микроорганизмов

Из культур чумного, сибиреязвенного, туляремийного микроба или подозрительных изолятов готовят суспензии в 2 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР) (0,15 М натрия хлорида, 0,01 М однозамещённого калия фосфата, 0,015 М двузамещённого натрия фосфата, pH 7.6) до оптической плотности, соответствующей 10 ЕД стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для *Y. pestis*, 5×10^8 м.к./мл *B. anthracis* и 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 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^3$ м.к./мл. ДНК выделяют из 100 мкл суспензии.

6.2. 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).

Непригодными для исследования являются образцы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

Аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом. Вносят 1,5 мл в микропробирку и центрифугируют при 800 об/мин (380 g при диаметре ротора 50 мм) в течение 10 мин; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами переносят в другую микропробирку и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) удаляют, а осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости используют для обеззараживания материала и выделения ДНК.

6.3. 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, β -меркаптоэтанол 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.

6.4. 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.

6.5. Мазок из носоглотки

Взятие мазка из носоглотки проводят натошак или не ранее, чем через 2-4 часа после еды. Корень языка придавливают шпателем, 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.

6.6. Пунктаты бубона, детрит 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.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

К работе с набором реагентов «MULTI-FLU сухой» допускаются медицинские специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).

7.1. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

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 групп патогенности».

К исследуемым образцам добавляют раствор 0,1% мертиолята натрия до концентрации 0,01 % с последующим прогреванием их при $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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 $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

Обработка исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) бактериями II–IV групп патогенности, образующими споры, проводится следующим способом.

Исследуемый материал в количестве 0,1 мл засевают в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера, pH 7,2 и инкубируют с аэрацией при 37°C в течение 2,5 ч. Добавляют пенициллин до конечной концентрации 1000 ед/мл и инкубируют при 37°C в течение 15 мин. После инкубации с пенициллином, исследуемый материал прогревают на водяной бане в течение 10 мин. при температуре 100°C . Затем 100 мкл обработанного образца переносят в пробирки объемом 1,5 мл и добавляют лизирующий раствор, приготовленный на основе 6 М гуанидинтиоизоцианата в объеме, указанном в инструкции по применению к набору реагентов, и инкубируют 15 мин при 65°C . После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

7.2.ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Выделение ДНК из проб, содержащих (подозрительных на содержание) возбудителей *Y. pestis*, *F. tularensis* и *B. anthracis*, для анализа методом ПЦР в режиме «реального времени» проводят в соответствии с методическими указаниями «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09» в условиях, предусматривающих работу с возбудителями особо опасных инфекционных заболеваний согласно СП 1.3.3118-13.

Для экстракции ДНК из клинического материала используют коммерческие наборы, разрешенные к применению и зарегистрированные в установленном порядке (например, Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «Рибо-сорб» РУ ФСР 2008/03993 от 16.11.2011 г, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора ; Комплект реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» РУ ФСР 2012/14019 от 06.09.2013 г, фирмы ООО «НекстБио», Россия; или аналогичные. Работу проводят в соответствии с инструкциями к наборам, начиная с этапа добавления нуклеосорбента.

Полученный препарат ДНК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «MULTI-FLU сухой».

7.3. ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов «MULTI-FLU сухой» предусмотрено использование внутреннего контрольного образца, который находится в реакционной смеси. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов нуклеотидной последовательности внутреннего контрольного образца, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта. Добавление антикоагулянтов может вызывать интерференцию с некоторыми аналитическими методами лабораторного анализа (ингибирование метаболических или каталитических реакций гепарином, например, Taq - полимеразы в полимеразной цепной реакции), поэтому использовать гепарин в качестве антикоагулянта при ПЦР-исследованиях не допускается!

7.4. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- подготовка пробирок для амплификации;
- проведение ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов.

В каждую постановку обязательно включают положительный (ПКО), отрицательный (ОКО) контрольные образцы.

7.4.1. Подготовка пробирок для амплификации

В пробирку с сухим содержимым ПКО добавляют 100 мкл раствора для растворения ПКО, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об/мин для сброса капель. После вскрытия, разведения и отбора необходимого количества ПКО, оставшийся раствор ПКО тщательно закрывают, замораживают и хранят при температуре минус 20 °С. При необходимости раствор ПКО многократно размораживают в течение срока годности

Отбирают необходимое количество стрипованных пробирок с сухой реакционной смесью. Оставшееся количество стрипованных пробирок в пакете тщательно закрывают. Стрипованные микропробирки помещают в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирок.

В каждую стрипованную микропробирку вносят по 20 мкл разбавителя (РБ). Оставшуюся часть разбавителя в пробирке закрывают крышкой и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С до конца срока годности.

Используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в отобранные и подписанные стрипованные микропробирки, соответственно порядку исследования образцов, по 5 мкл ОКО, ПКО и исследуемых образцов, закрывают крышки микропробирок.

Рабочее количество стрипованных микропробирок перемешивают на встряхивателе и центрифугируют 3-5 секунд для сброса капель.

Подготовленные стрипованные микропробирки помещают в амплификатор (например Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories Inc., США, РУ ФЗС 2008/03399 от 21.06.2016 г)

7.4.2. Проведение ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

Для работы с прибором «CFX96» BIO-RAD используют программу Bio-Rad CFX Manager.

- В открывшемся окне программы выбирают меню «File»/«Файл». Нажимают кнопку «New»/«Новый».
- Далее нажимают кнопку «Experiment»/«Эксперимент». Открывается окно, «Experiment setup»/« Установка эксперимента». На данном графическом интерфейсе, выделено три кнопки «Protocol»/«Протокол», «Plate»/«Вкладка» «Start Run»/«Старт». Далее открывают вкладку «Protocol»/«Протокол».
- Задают параметры эксперимента.
- Указывают объем реакционной смеси.
- Hold/Удерж. температуры 95 °C – 5 мин
- Cycling/Циклирование 62 °C – 40 с
95 °C – 15 с

Cycle repeats/Цикл повторить – 45 раз.

- Флюоресценцию измеряют по каналам ROX, HEX, FAM, Cy5.
- Нажимают кнопку «OK»/«Да».
- Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
- Далее открывают вкладку «Plate»/«Вкладка»
- Задают параметры расположения пробирок в меню «Plate», выбирают канал детекции ROX, HEX, FAM, Cy5, тип пробирок. Все пробы и контроли обозначают в меню Plate как Unknown/Неизвестный.
- Нажимают кнопку «Next»/«Далее».
- Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт».

Регистрация результатов

- Дают название эксперимента и сохраняют его на диске (в этом файле будут

автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

- Регистрация результатов амплификации по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5.
- Нажимают в меню кнопку «File»/«Файл», далее кнопку «Open»/Открыть, далее кнопку «Data file» выбирают протокол анализа.
- В таблице результатов регистрируют значения Ct.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 года № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является *одним из методов* всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Результаты анализа *не подлежат* учету в случае:

- регистрации прибором **ОКО** по каналам **FAM, HEX и ROX**;
- отсутствия регистрации прибором **ОКО** по каналу **Cy5**;

Результаты анализа *подлежат* учету в случае:

- отсутствия регистрации прибором **ОКО** по каналам **FAM, HEX и ROX**;
- регистрации прибором **ОКО** по каналу **Cy5**;
- регистрации прибором **ПКО** по каналам **FAM, HEX и ROX**.

Нуклеотидная последовательность внутреннего положительного контроля присутствует во всех образцах и должна регистрироваться всех пробах по каналу Cy5. Регистрация **ОКО** по каналу **Cy5** свидетельствует об отсутствии ингибиторов ПЦР. Образец считается положительным на присутствие специфических фрагментов геномной ДНК *B. anthracis*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **FAM** (зонда, специфичного для фрагмента ДНК гена *sspE* хромосомы *B. anthracis*), а значение порогового цикла меньше 45, и отрицательным, если автоматически значение порогового цикла не определено.

Образец считается положительным на присутствие специфических фрагментов геномной ДНК *F. tularensis*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **HEX** (зонда, специфичного для фрагмента ДНК гена элемента вставки *ISFtu5 F. tularensis*), а значение порогового цикла меньше 45, и отрицательным, если автоматически значение порогового цикла не определено.

Образец считается положительным на присутствие специфических фрагментов геномной ДНК *Y. pestis*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **ROX** (зонда, специфичного для фрагмента ДНК гена метилтрансферазы *Y. pestis*), а значение порогового цикла меньше 45, и отрицательным, если автоматически значение порогового цикла не определено.

По каналу **Cy5** внутренний положительный контроль - контролируют наличие в образце ингибиторов реакции амплификации, образующихся при выделении ДНК и в процессе пробоподготовки. Образец считается положительным на присутствие внутреннего положительного контроля, если значение порогового цикла меньше 45 и отрицательным, если автоматически значение порогового цикла не определено.

Результат анализа **отрицательного контрольного образца (ОКО)** должен быть отрицательным для реакций на *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis* (каналы FAM, HEX и ROX) и положительным для внутреннего положительного контроля (канал Cy5). В случае получения положительных результатов для образцов отрицательного контроля на *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis* результаты определения считаются недействительными. В этом случае необходимо повторить постановку и, если это необходимо, провести специальные мероприятия по выявлению и устранению источника контаминации (реактивы для ПЦР и комната для подготовки к проведению реакции).

Результаты анализа исследуемых образцов принимаются только при выполнении ВСЕХ вышеперечисленных условий для контрольных образцов!

Результат анализа на обнаружение ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии считается:

– **Положительным**, если реакция на *B. anthracis*, *F. tularensis* или *Y. pestis* оценены как положительные: наличие положительной динамики изменения флуоресценции по каналу **FAM** (отсутствие флуоресценции по каналам **HEX** и **ROX**) относительно отрицательного контроля свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов геномной ДНК *B. anthracis* в пробе; наличие положительной динамики изменения флуоресценции по каналу **HEX** относительно отрицательного контроля (отсутствие флуоресценции по каналам **FAM** и **ROX**) свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов геномной ДНК *F. tularensis* в пробе; наличие положительной динамики изменения флуоресценции по каналу **ROX** (отсутствие флуоресценции по каналам **FAM** и **HEX**) относительно отрицательного контроля свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов геномной ДНК *Y. pestis* в пробе.

– **Отрицательным**, если реакция на *B. anthracis*, *F. tularensis* и *Y. pestis* оценены как отрицательные, реакция на внутренний положительный контроль оценена как положительная.

– **Недостоверным**, если реакция на *B. anthracis*, *F. tularensis* и *Y. pestis* оценены как отрицательные, реакция на внутренний положительный контроль оценена как отрицательная. Следовательно, образец ингибирован, и необходимо либо его предварительное разведение перед реакцией амплификации, либо выделение ДНК заново.

9. УТИЛИЗАЦИЯ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковки, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Уничтожение наборов реагентов после проведения исследования осуществляется по СанПиН 2.1.7.2790-10 как отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 2 ч при температуре $(126 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Уничтожение наборов реагентов, пришедших в негодность (нарушение целостности упаковки), а также в связи с истекшим сроком годности, утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 как медицинские отходы, принадлежащие к классу «А» - эпидемиологически безопасные отходы, любым способом, предотвращающим повторное использование, например, сжиганием.

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. Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

10. СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Набор реагентов «MULTI-FLU сухой» в упаковке изготовителя должен храниться на складах в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C .

После первого вскрытия пробирки с сухим ПКО, его разведения и отбора необходимого количества, оставшийся раствор ПКО тщательно закрывают, замораживают и хранят при температуре от минус 18 до минус 20°C . При необходимости раствор ПКО многократно размораживают в течение срока годности.

После первого вскрытия пакета со стрипованными микропробирками с сухой реакционной смесью отбирают необходимое количество микропробирок для проведения анализа. Оставшееся количество стрипованных пробирок с сухой реакционной смесью в пакете тщательно закрывают и хранят при температуре от 2°C до 8°C .

Оставшуюся часть разбавителя и ОКО в пробирках тщательно закрывают крышками и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С до конца срока годности.

Набор реагентов «MULTI-FLU сухой», хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит!

СРОК ГОДНОСТИ 18 месяцев.

Набор реагентов «MULTI-FLU сухой» с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке применению не подлежит.

Набор реагентов «MULTI-FLU сухой» транспортируют при температуре от 2 до 8 °С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор реагентов «MULTI-FLU сухой» транспортируемый с нарушением температурного режима, применению не подлежит!

Изготовитель гарантирует соответствие медицинского изделия **Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии «MULTI-FLU сухой» по ТУ 21.20.23-296-78095326-2018** заявленным требованиям и функциональным характеристикам с начала использования в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей Инструкции по применению.

По всем вопросам, касающимся качества медицинского изделия Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии «MULTI-FLU сухой» по ТУ 21.20.23-296-78095326-2018 обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-03; факс (4967) 36-00-10; тел/факс (4967) 36-01-16.

Зам. директора ФБУН ГНЦ ПМБ



М.В. Храмов

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДИЦЕНТР»

Варнавичус П.К.

«12» февраля 2019 г.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 16 ЛИСТОВ

«12» 02 2019 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

