

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 20 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора
д.м.н., профессор
_____ И.А. Дятлов
«_____» _____ 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ, СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ТУЛЯРЕМИИ МЕТОДОМ
ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
«MULTI-FLU»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «MULTI-FLU» предназначен для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) в режиме реального времени.

1.2. Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

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.

При амплификации используют одновременно восемь олигонуклеотидных праймеров, комплементарных фрагменту ДНК гена метилтрансферазы *Y. pestis*, фрагменту ДНК гена элемента вставки ISFtu5 *F. tularensis*, фрагменту ДНК гена *sspE* хромосомы *B. anthracis*, а также ДНК внутреннего положительного контроля и четыре флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторении циклов температурной денатурации ДНК, отжиге праймеров и зондов и последующей достройке полинуклеотид-

ных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов по изменению флуоресценции в режиме реального времени.

2.2. Состав набора

Набор реагентов состоит из 7 пробирок с реагентами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Набор реагентов для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Набор рассчитан на 100 определений.

№	Состав набора	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь, РС	прозрачная бесцветная жидкость	550 мкл	4 пробирки
2.	Фермент, Taq ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость	55 мкл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец ДНК <i>Y. pestis</i> , <i>F. tularensis</i> и <i>B. anthracis</i> , ПКО	прозрачная бесцветная жидкость	100 мкл	1 пробирка
4.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	200 мкл	1 пробирка

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Диагностическая чувствительность (доля правильных положительных результатов) - не менее 85 %. Набор реагентов должен выявлять ДНК каждого возбудителя - *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* и *Francisella tularensis* в концентрации 1×10^4 м.к./мл каждого возбудителя.

3.2. Диагностическая специфичность (доля правильных отрицательных результатов) - не менее 90 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 3 (Приказ МЗ РФ № 4н от 06.06.2012 г).

4.2. Работу проводят в соответствии с санитарными правилами СП 1.3. 1285 – 03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.3. Уничтожение использованных наборов реагентов, а также наборов с истекшим сроком годности проводить сжиганием.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1. Для проведения ПЦР в режиме реального времени требуется:

- настольный бокс с бактерицидной лампой (например «Циклотемп» СП «РТС») или стерильный ламинарный шкаф;

- микроцентрифуга-вортекс;
- микроцентрифуга для стрипов;
- амплификатор для ПЦР-РВ;
- 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 для постановки ПЦР в режиме реального времени переменного объема;
- отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки;
- штативы для наконечников, микропробирок на 0,2 и 1,5 мл;
- холодильник на 2-8 °С и на минус 20 °С;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат: суспензии культур исследуемых микробов или подозрительных изолятов; кровь, мокрота, промывные воды бронхов, мазок из носоглотки, пунктаты бубона, отделяемое язв; органы грызунов, зайцеобразных, насекомоядных и наземных хищников; эктопаразиты (блохи, клещи, комары); почва, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников, вода открытых водоемов.

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично завинчивающимися крышками в соответствии с требованиями СП 1.3. 1285 – 03 «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», 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 от минус 16 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 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-86П), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для *Y. pestis* и *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 1×10^5 - 1×10^3 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). Аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом. Вносят 1,5 мл в микропробирку и центрифугируют при 8000 об/мин (380 g при диаметре ротора 50 мм) в течение 10 минут; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами переносят во другую микропробирку и центрифугируют при 8000 g 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 (рН 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 натощак 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, 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.

6.7. 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.

6.8. 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.

Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.1027-01 "Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих - переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций".

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 гомогенизованную 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.

6.9 Почва, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы, 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 ре-

успендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

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, рН 7,2 и инкубируют с аэрацией при 37 °С в течение 2,5 ч. Добавляют пенициллин до конечной концентрации 1000 ед/мл и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. После инкубации с пенициллином, исследуемый материал прогревают на водяной бане в течение 10 мин. при температуре 100 °С. 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 °С. После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

6.10. 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 флакон или стерильный пластиковый пакет типа «Вихрь» объемом 100 мл, содержащих 10 мл 0,9 % раствора натрия хлористого. Флакон встряхивают в течение 10 мин с помощью шейкера, фильтр внутри пакета типа «Вихрь» растирают вручную в течение 1 мин. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР от-

бирают 1,0 мл в микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12000 в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

6.11. 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 групп патогенности».

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

К исследуемым образцам и ОКО-В 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 и ОКО-В, обработанных мертиолятом натрия и разлитых в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий буфер на основе 6 моль гуанидинотиоцианата 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.

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, рН 7,2 и инкубируют с аэрацией при 37 °С в течение 2,5 ч. Добавляют пенициллин до конечной концентрации 1000 ед/мл и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. После инкубации с пенициллином, исследуемый материал прогревают на водяной бане в течение 10 мин. при температуре 100 °С. 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 °С. После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

6.12. Выделение ДНК

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 1.3.1285-03.

Для выделения ДНК из биологического материала и объектов окружающей среды используют сертифицированные коммерческие наборы, например набор реагентов серии «ДНК-экстран» для выделения ДНК из крови, тканей и культур клеток (кат. номер EX-509, EX-511 и EX-512, фирма «Синтол» Россия), набор реагентов для выделения ДНК из объектов окружающей среды «М-Сорб_ОМ» (кат. номер ОМ-502, фирма «Синтол», Россия), наборы Диа-сорб, Рибо-сорб фирмы «Интерлабсервис» 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».

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ с помощью набора реагентов состоит из двух этапов:

- проведение ПЦР в режиме реального времени;
- учет результатов анализа.

В каждую постановку обязательно включают положительный (ПКО), отрицательный (ОКО) контрольные образцы и отрицательный контрольный образец выделения (ОКО-В).

7.1. Подготовка к проведению реакции ПЦР в режиме реального времени.

- 7.1.1. Взять необходимое количество пробирок для амплификации из расчета **N+3**, где N- количество исследуемых образцов. Поместить пробирки в штатив. Маркировать пробирки в соответствии с протоколом исследования. Для приборов, производящих измерение через крышку пробирки, маркировку наносить на стенку пробирки; для приборов, производящих измерение через стенку пробирки – на крышку.
- 7.1.2. Реакционную смесь разморозить, перемешать на встряхивателе и центрифугировать 3-5 секунд для сброса капель. Приготовить рабочую реакционную смесь из расчета: **20** мкл реакционной смеси, **0,5** мкл фермента – на каждую пробирку. Для N количества исследуемых проб рабочая реакционная смесь составит: **20,5 * (N+3)** мкл. Перемешать на встряхивателе.
- 7.1.3. Внести в приготовленные ПЦР пробирки по **20** мкл приготовленной рабочей реакционной смеси.

7.1.4. Положительный, калибровочные, отрицательные контрольные образцы ПЦР и исследуемые образцы разморозить, перемешать на встряхивателе и центрифугировать 3-5 секунд для сброса капель.

7.1.5. Внести в пробирки (на стенку пробирок) по 5 мкл отрицательных контрольных образцов (ОКО и ОКО-В), исследуемых образцов и, в последнюю очередь, положительных контрольных образцов ДНК в соответствии с маркировкой, используя наконечники с аэрозольным барьером, перемешать на встряхивателе и центрифугировать.

Подготовленные микропробирки помещают в амплификатор «CFX96» BIO-RAD.

7.2. Программирование амплификатора:

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 – 50 times/раз.
- Флюоресценцию измеряют по каналу 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».

7.3. 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 РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты анализа не подлежат учету:

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

Результаты анализа подлежат учету:

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

Регистрация **ОКО** и **ОКО-В** по каналу **Cy5** свидетельствует о выделении ДНК в процессе пробоподготовки и 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 50, 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 50, 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 50, и отрицательным, если автоматически значение порогового цикла не определено.

По каналу **Cy5** внутренний положительный контроль (ВПК) - контролируют наличие в образце ингибиторов реакции амплификации, образующихся при выделении ДНК и в процессе пробоподготовки. Образец считается положительным на присутствие ВПК, если значение порогового цикла меньше 50 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 ВПК (канал Cy5). В случае получения положительных результатов для ОКО по реакции на *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis* результаты определения всех положительных образцов 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).

Результат анализа **отрицательного контрольного образца выделения ОКО-В** должен быть отрицательным для реакций на *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis* и положительным для ВПК (канал Cy5). В случае получения положительных результатов для ОКО-В на *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis* результаты определения всех положительных образцов считаются недействительными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации (реактивы и помещение для выделения ДНК) и провести повторное выделение и анализ всех положительных проб.

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* или, *Y. pestis* оценены как отрицательные, реакция на внутренний положительный контроль оценена как положительная.

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

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

9.1. Условия хранения

В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 18 до минус 20 °С. Допускается повторное замораживание после вскрытия набора и начала эксплуатации.

9.2. Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «MULTI-FLU» должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 6 °С не более 3 суток, при температуре от минус 18 до минус 20 °С – в течение срока годности.

9.3. Срок годности

Срок годности набора реагентов составляет 6 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.