

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека (ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора)



В.В. Малеев

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «СИБ-ДИФ» для выявления и идентификации спор и вегетативных форм *Bacillus anthracis* методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «СИБ-ДИФ» предназначена для выявления ДНК вегетативных форм и спор *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды, а также для определения плазмидного состава *B. anthracis* путем выявления ДНК генов факторов вирулентности – гена *pagA* (плазмида рХО1) и гена *capA* (плазмида рХО2) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК *Bacillus anthracis* основан на экстракции ДНК из биологического материала, совместно с ДНК экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), проведении амплификации полученной ДНК и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени». Результат амплификации участка ДНК гена фактора вирулентности *pagA* (рХО1) регистрируется по каналу для флуорофора FAM, результат амплификации участка ДНК гена *capA* (рХО2) – по каналу для флуорофора JOE, результат амплификации экзогенного ВКО – по каналу для флуорофора ROX. Использование экзогенного ВКО позволяет

контролировать основные этапы ПЦР-анализа (экстракцию ДНК и проведение амплификации ДНК).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

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

Чувствительность тест-системы при исследовании проб объектов окружающей среды, биологического материала и чистых культур *B. anthracis* составляет 1×10^3 м.к./мл.

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

Аналитическая специфичность

Специфичность тест-системы доказана при тестировании 30 штаммов сапрофитов *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*; штаммов бактерий родов *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia*; 50 образцов ДНК, полученной из крови и паренхиматозных органов здоровых животных.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК спор и вегетативных форм *Bacillus anthracis* с гибридационно-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 – комплект реагентов для амплификации участков ДНК спор и вегетативных форм *Bacillus*

anthracis с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Bacillus anthracis</i> , раскапана под воск	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Bacillus anthracis</i> pXO1	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Bacillus anthracis</i> pXO2	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,2	1 пробирка
ВКО STI-704	0,5	1 пробирка

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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

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

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.

- Уничтожать образцы в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности).
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания 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 «Состав»).

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В».
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
7. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»,

имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ/ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, или другие, рекомендованные Изготовителем).

9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Для проведения анализа используют:

Объекты окружающей среды:

- Вода (сточная, из водоема, питьевая) – 10-20 мл.
- Почва.
- Смывы с воздушных фильтров.

Порошкообразные вещества (корма для КРС, мука и т.д.)

Материал от животных:

- Цельная кровь – 5 мл. Взятие крови проводится в пробирку типа Vacuette, с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант.
- Молоко КРС.
- Тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, лимфоузлы).

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С.

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

Допускается хранение остальных видов материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре не выше минус 16 °С в течение месяца;

– при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

Предварительная обработка материала

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием стерильных ступок, пестиков, инструментов (ножниц, пинцетов, скальпелей), пипеточных дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и 10,0 мл и наконечников с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания биоматериалов (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты). Ступки, пестики и инструменты должны обрабатываться согласно СП 1.3.3118-13.

Вода и смывы с воздушных фильтров: 10-20 мл воды центрифугировать 15 мин на центрифуге при 8000 г (10 000 об/мин при радиусе ротора 70 мм или 3 000 об/мин при радиусе ротора 150 мм). Надосадочную жидкость следует осторожно удалить, оставив 100 мкл надосадочной жидкости (осадок может быть не виден). Для окончательной обработки использовать осадок, который необходимо ресуспендировать в оставленном объеме 100 мкл и перенести в пробирки на 1,5 мл.

Почва:

А. Обработка этанолом.

В пробирки на 5 мл с плотно закрывающейся (завинчивающейся) крышкой отдельным шпателем (или одноразовыми лопатками) внести по 0,4-1,0 г (около 1,0 мл) земли, залить равным объемом 70 % этанола и выдержать в течение 10 мин.

Б. Приготовление 10-20 % взвеси.

В каждую пробирку внести по 3 мл физиологического раствора, тщательно перемешать и декантировать 5 мин.

Приготовить пробирки на 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой.

В. Приготовление осветленного экстракта.

Из пробирок с декантированной землей перенести 1 мл раствора и осадить грубодисперсную фракцию центрифугированием на микроцентрифуге 2-3 мин при 300 g (2000 об/мин при радиусе ротора 70 мм). Осветленная надосадочная жидкость используется для окончательной обработки.

Порошкообразные вещества: полностью растворимые в воде вещества (объем около 0,05 мл) растворить в 150 мкл стерильного физиологического раствора. Далее в работе используется полученный раствор.

Нерастворимые в воде вещества следует обрабатывать аналогично пробам земли, начиная с пункта Б.

Молоко КРС – не требует предварительной обработки.

Паренхиматозные органы (кусочки размером не менее 1 см³) и лимфоузлы (целиком) тщательно растирают в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавляют равный объем (не менее 100 мкл) стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают. Суспензию декантируют при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в пробирки вместимостью 1,5 мл и используют для окончательной обработки.

Окончательная обработка материала

Проводится согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Герминация спор.

Предварительно подготовленный исследуемый материал в количестве 0,1 мл засевают в пробирки (объемом 1,5 мл с застегивающимися или завинчивающимися крышками) с 0,9 мл бульона Brain-Heart или бульон Хоттингера (pH 7.2) и инкубируют (с перемешиванием) при температуре 37 °С в течение 2,5 ч.

Обработка пенициллином.

В пробирки добавить пенициллин (до конечной концентрации 1000 ед/мл) и инкубируют 15 мин при температуре 37 °С.

Суспензии перенести в пробирки на 1,5 мл с завинчивающимися крышками, снабженными резиновыми прокладками и провести центрифугирование при 12 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отобрать наконечником с фильтром, к осадку добавить 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, ресуспендировать наконечником с фильтром.

Пробирки прогреть в твердотельном термостате при температуре (100 ± 1) °С в течение 10 мин.

Лизирующий раствор из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов. В каждую пробирку внести по 300 мкл лизирующего раствора и инкубировать в течение 15 мин при температуре 65 °С.

После проведения окончательной обработки материала дальнейшие исследования с ним проводятся как с обеззараженным материалом по порядку процедур, описанных в разделе «Экстракция ДНК из исследуемого материала».

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Экстракция ДНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Подготовить **отрицательный контроль экстракции ДНК (ОК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести **300 мкл лизирующего раствора** и **100 мкл ОК** (отрицательного контрольного образца).

Отдельными наконечниками с фильтром внести в каждую пробирку (см. пункт **Окончательная обработка материала**), включая **ОК** по **10 мкл ВКО STI-704** (внутреннего контрольного образца).

Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть в термостате 5 мин при температуре 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), то необходимо процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-10 тыс

об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.

Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить процедуру отмывки **раствором для отмывки 2**, удалить надосадочную жидкость полностью.

Поместить пробирки в термостат 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при тем-

пературе от 2 до 8 °С, и в течение года при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Аmplификация и детекция продуктов амплификации

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT *Bacillus anthracis*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FRT *Bacillus anthracis*.

В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК** исследуемых образцов или контролей полученных на этапе экстракции.

Поставить **контрольные реакции:**

- а) отрицательный контроль (К–)** – в подготовленные для ПЦР пробирки внести **10 мкл ДНК-буфера**.
- б) положительный контроль (К1+)** – в подготовленные для ПЦР пробирки внести **10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО1**.
- в) положительный контроль (К2+)** – в подготовленные для ПЦР пробирки внести **10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО2**.
- г) положительный контроль (ВК+)** – в подготовленные для ПЦР пробирки внести **10 мкл ПКО STI-88**.

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

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 2.

Анализ и интерпретация результатов

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 отсутствия) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена ДНК *B. anthracis* pXO1**, если для данной пробы значение *Ct* по каналу для флуорофора FAM менее 33.

В образце **обнаружена ДНК *B. anthracis* pXO2**, если для данной пробы значение *Ct* по каналу для флуорофора JOE менее 33.

В образце **не обнаружена ДНК *B. anthracis* pXO1 и ДНК *B. anthracis* pXO2**, если по каналам для флуорофоров FAM и JOE значение *Ct* отсутствует (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу для флуорофора ROX определено значение *Ct*, не превышающее 31.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 1).

Таблица 1

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	≤ 31
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K1+	ПЦР	≤ 33	отсутствует	отсутствует
K2+	ПЦР	отсутствует	≤ 33	отсутствует
BK+	ПЦР	отсутствует	отсутствует	≤ 31

Оценка результатов исследуемых проб

	Значение порогового цикла (Ct)			Результат анализа
	ROX	FAM	JOE	
1	≤ 31	–	–	<i>B. anthracis</i> не обнаружена
2	≤ 31	≤33	–	<i>B. anthracis</i> (pXO1+ / pXO2-)
3	≤ 31	≤33	≤33	<i>B. anthracis</i> (pXO1+ / pXO2+)
4	≤ 31	–	≤33	<i>B. anthracis</i> (pXO1- / pXO2+)
5	Нет	Нет	Нет	Проба подлежит повторному анализу с этапа экстракции ДНК

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM, JOE отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 1. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров FAM, JOE и для отрицательного контроля ПЦР (К–) на любом из каналов определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Bacillus anthracis* хранить в защищенном от света месте.

Холодильные 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 «СИБ-ДИФ» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru².

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ 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 амплификации 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 мест** 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 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 3

Программа амплификации *B.anthraxis*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	95	5 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	–	10
	60	25 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	35
	56	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 с	–	

Флуоресценцию измеряют при 56 °C (во втором блоке циклирования) на каналах **FAM/Green**, **JOE/Yellow** и **ROX/Orange**.

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 канала FAM/Green установить параметры **Min reading/Миним сигнал** – 20FI и **Max reading/Максим сигнал** – 30FI. Для канала JOE/Yellow установить параметры **Min reading/Миним сигнал** – 10FI и **Max reading/Максим сигнал** – 15FI. Для канала ROX/Orange 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 пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО (канал ROX/Orange):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- 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 **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** выставить **Threshold/Порог = 0,1**.

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

Анализ результатов амплификации ДНК *B. anthracis* рХО1 (канал 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**.
- 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 (**Quantitation**

analysis/Количественный анализ) должна быть нажата кнопка *Dynamic tube/Динамич.фон.*

- В меню *CT Calculation/Вычисление СТ* выставить *Threshold/Порог = 0,025*.

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

Анализ результатов амплификации ДНК *B. anthracis* pXO2 (канал JOE/Yellow):

- Нажать в меню кнопку *Analysis/Анализ*, выбрать режим анализа *Quantitation/Количественный*, нажать кнопку *Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать*.

- Отменить автоматический выбор *Threshold/Порог*.

- 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 (*Quantitation analysis/Количественный анализ*) должна быть нажата кнопка *Dynamic tube/Динамич.фон.*

- В меню *CT Calculation/Вычисление СТ* выставить *Threshold/Порог = 0,1*.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала.

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE и ROX**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
- Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE и ROX**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованную ранее схему планшета, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной

схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.
Задать программу амплификации.

Таблица 4

Программа амплификации *B.anthraxis*

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	5 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	25с		
	72	25 с		
3	95	10 с	FAM, JOE, ROX	35
	56	25 с		
	72	25 с		

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: Cycle 4 – Step 2. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename (B.anthraxis.tmo)** и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Запустить выполнение выбранной программы **B.anthraxis** с заданной схемой планшета.

- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Exper-**

imental Plate. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО (канал ROX):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **ROX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **ROX-575**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК *B. anthracis* pXO1 (канал FAM):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**, отключив кнопку **ROX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК *B. anthracis* pXO2 (канал JOE):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**, отключив кнопки **FAM** и **ROX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно

перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Изготовитель		