

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 09.04.08 № 2617-Пп/08

«УТВЕРЖДАЮ»

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


В.И.Покровский
«20» декабря 2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом
материале и объектах окружающей среды методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиСенс[®] *Bacillus anthracis*-FRT»

Набор реагентов состоит из 2 комплектов реагентов:

- **«ДНК-сорб-В» вариант 50** – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала;
- **«ПЦР-комплект» вариант FRT** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bacillus anthracis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Допускается комплектация без комплекта реагентов «ДНК-сорб-В».

ФОРМА ВЫПУСКА.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 включает:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем (мл)</i> | <i>Кол-во</i> |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT включает:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем (мл)</i> | <i>Кол-во</i> |
|---|---|-------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FRT <i>Bacillus anthracis</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,008 | 55 пробирок |
| ПЦР-смесь-2-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,77 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Bacillus anthracis</i> рХО1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Bacillus anthracis</i> рХО2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ОКО | Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного | 1,6 | 1 пробирка |
| ВКО STI-704 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

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

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT» предназначен для выявления ДНК вегетативных и споровых форм *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды, а также для определения плазмидного состава *Bacillus anthracis* путем выявления гена *pagA* (плазмида рХО1) и гена *capA* (плазмида рХО2) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Один набор рассчитан на 50 тестов, включая контрольные образцы.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Взятие, транспортирование, хранение материала на исследование и работу с ним проводят в соответствии с инструктивно-методическими документами, регламентирующими выполнение исследований: СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА НА ИССЛЕДОВАНИЕ.

Для проведения анализа используются следующие материалы:

- Вода (сточная, из водоема, питьевая) – 10-20 мл.
- Почва.
- Смывы с воздушных фильтров.
- Порошкообразные вещества (корма для крупного рогатого скота (КРС), мука и т.д.)

Материал от людей:

- Цельная кровь – 5 мл. Забор крови проводится утром натощак в пробирку типа Vacuette®, с 6 % раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз тщательно перемешивают путем

переворачивания.

- Экссудат из очагов поражения (при кожной форме), помещенный в 200 мкл стерильного раствора натрия хлорида 0,9 % (используют без предварительной обработки).
- Мокрота – в емкость с мокротой, для ее разжижения, добавляют коммерческий реагент «Муколизин» производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Предобработка мокроты проводится по инструкции к реагенту «Муколизин». При необходимости повторного проведения анализа остаток обработанной мокроты замораживают.

Материал от животных:

- Цельная кровь – 5 мл. Забор крови проводят в пробирку типа Vacuette[®], с 6 % раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант.
- Молоко КРС – без предварительной обработки.
- Паренхиматозные органы и лимфоузлы.

Биологический материал доставляют в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 сут.

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и в течение 6 мес при температуре не выше минус 16 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Предварительная обработка материала:

Вода и смывы с воздушных фильтров.

10-20 мл воды центрифугировать 15 мин на центрифуге при 8000 g (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. Осадок ресуспендировать в объеме 100 мкл и перенести в пробирки на 1,5 мл.

Почва:

В пробирки объемом 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 3 мл раствора натрия хлорида 0,9 %, тщательно перемешать и отстаивать 5 мин. Из пробирок с отстоявшейся землей перенести 1 мл раствора в пробирки объемом 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой и осадить грубодисперсную фракцию центрифугированием на микроцентрифуге 2-3 мин при 300 g (2000 об/мин при радиусе ротора 70 мм). Далее использовать осветленную надосадочную жидкость.

Порошкообразные вещества.

Порошкообразные вещества (объем около 0,05 см³) растворить в 150 мкл стерильного раствора натрия хлорида 0,9 % и использовать полученный раствор в работе.

Нерастворимые в воде вещества следует обрабатывать аналогично пробам земли.

Паренхиматозные органы.

Кусочки размером не менее 1 см³ и лимфоузлы (целиком) тщательно растереть в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавить равный объем (не менее 100 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешать. Суспензию отстаивать при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл и использовать далее на стадии обеззараживания.

Обеззараживание материала:

Проводят согласно МУ 3.5.5.1034-01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

1. Герминация спор.

Предварительно подготовленный исследуемый материал в количестве 0,1 мл мерной пипеткой емкостью 1-2 мл 2 класса точности засеять в пробирки (ГОСТ 1770-74) с 0,9 мл бульона Хоттингера pH 7,2±0,1 и инкубировать с интенсивной аэрацией на шуттель-аппарате при температуре (37±1) °C в течение 2,5 ч.

2. Обработка пенициллином.

В пробирки добавить свежеприготовленный раствор пенициллина (до конечной концентрации 1000 ед/мл) и

- инкубировать еще 15 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.
3. 1 мл суспензии перенести автоматической пипеткой с наконечниками с аэрозольным барьером в пробирки объемом 1,5 мл (с застегивающимися или завинчивающимися крышками, снабженными резиновыми прокладками) и подвергнуть центрифугированию при 12 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отобрать, к осадку добавить 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, ресуспендировать. Пробирки прогреть в твердотельном термостате при температуре $(110 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 10 мин.
 4. 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 с исследуемыми пробами внести по 300 мкл лизирующего раствора и инкубировать в течение 15 мин при температуре 65 °С.

Дальнейшие исследования проб проводить как с обеззараженным материалом по порядку процедур, описанных в разделе «ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК».

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

**Для выделения ДНК из исследуемого материала
требуются:**

1. Стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или

плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).

8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
14. Комплект средств для обработки рабочего места.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации и детекции продуктов амплификации требуются:

1. Амплификатор «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или эквивалентный.
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
6. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.
10. Комплект средств для обработки рабочего места.

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

(Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50).
(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).

Порядок работы.

1. Подготовить **отрицательный контроль выделения ДНК (ОК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести **300 мкл лизирующего раствора** и **100 мкл ОКО** – отрицательного контрольного образца.
2. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку с пробами (см. раздел «Обеззараживание биологического материала»), включая **ОК**, по **10 мкл ВКО STI-704**.
3. Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть 5 мин при температуре 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), то необходимо центрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.
4. 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.
5. 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.
6. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 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. При работе с образцами крови допустимо применение дозатора с индивидуальным наконечником с аэрозольным барьером для механического разбивания осадка.

7. 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 микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Повторить отмывку еще раз, следуя п. 7, удалить надосадочную жидкость полностью.
9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
10. 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.
11. 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.

Допускается хранение очищенной ДНК в течение 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ (Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT).

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации).

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

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-

полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при температуре 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Порядок работы:

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT *Bacillus anthracis*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб (1 – отрицательная и 3 – положительные контрольные пробы).
2. 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***.

Б. Проведение амплификации.

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести отдельными наконечниками с аэрозольным барьером по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль (К1+)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО1**.
 - в) **положительный контроль (К2+)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО2**.
 - г) **положительный контроль (ВК+)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ПКО ST1**.

В. Программирование амплификатора:

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором «Rotor-Gene» 6000- 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 / для

русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажать кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню «Advanced»/«Детальный мастер» и шаблон запуска эксперимента «Dual Labeled Probe»/«Hydrolysis probes»/«Флуоресцентные зонды (TaqMan)». Нажать кнопку «New»/«Новый».
3. Выбрать тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Поставить отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
4. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
5. Выбрать объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции -25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
6. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
7. В верхней части окна нажать кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
8. Задать следующие параметры эксперимента:
 1. «Hold»/«Удерж. темп-ры» 95 °C – 5 мин
 2. «Cycling»/«Циклирование» 95 °C – 10 с
60 °C – 25 с
72 °C – 10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
 3. «Cycling 2»/«Циклирование 2» 95 °C – 10 с
56 °C – 25 с – Детекция
72 °C – 10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.
 4. Флуоресценцию измеряют при температуре **56 °C** (во втором блоке циклирования) на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange**.
 5. Нажать дважды кнопку «OK»/«Да».
9. В нижней части окна нажать кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт. уровня сигн.». В открывшемся окне нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт. Детек-мых». 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. В графе «Tube position»/«Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Окно закрыть, нажав кнопку «**Close**»/«**Заккрыть**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».

10. Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**».

11. 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 карусели. 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**».

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации ВКО по каналу ROX/Orange.

1. Нажать в меню кнопку «**Analysis**»/«**Анализ**», выбрать режим анализа «**Quantitation**»/«**Количественный**», нажать кнопку «**Cycling A. ROX**»/«**Cycling A. Orange**», «**Show**»/«**Показать**».
2. Отменить автоматический выбор «**Threshold**»/«**Порог**».
3. 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»).
4. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
 5. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0.1.
 6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct, которые должны быть не более 31 для исследуемых образцов и контролей.

Анализ результатов амплификации ДНК *Bacillus anthracis* pXO1 по каналу FAM/Green.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», «Show»/«Показать».
2. Отменить автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. 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»).
4. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» выставить «Threshold»/«Порог» = 0.025.
6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации ДНК *Bacillus anthracis* pXO2 по каналу JOE/Yellow.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», «Show»/«Показать».
2. Отменить автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. 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»).

4. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» выставить «Threshold»/«Порог» = 0.1.
6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 1).

Таблица 1.
Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-анализа | Значение Ct по каналу | | |
|----------|---------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| | | FAM/Green | JOE/Yellow | ROX/Orange |
| «OK» | Выделение ДНК | Нет значений | Нет значений | < 31 |
| «К-» | ПЦР | Нет значений | Нет значений | Нет значений |
| «К1+» | ПЦР | < 33 | Нет значений | Нет значений |
| «К2+» | ПЦР | Нет значений | < 33 | Нет значений |
| «ВК+» | ПЦР | Нет значений | Нет значений | < 31 |

1. **Образец считают положительным на наличие ДНК *Bacillus anthracis* pXO1+ и pXO2+, если значение Ct по каналу FAM/Green и JOE/Yellow менее 33, не зависимо от значения Ct по каналу ROX/Orange.**
2. **Образец считают положительным на наличие ДНК *Bacillus anthracis* pXO1+, если значение Ct по каналу**

FAM/Green менее 33, не зависимо от значения Ct по каналу ROX/Orange.

3. **Образец считают положительным на наличие ДНК *Bacillus anthracis* pXO2+,** если значение Ct по каналу JOE/Yellow менее 33, не зависимо от значения Ct по каналу ROX/Orange.
4. **Образец считают отрицательным,** если по каналам FAM/Green и JOE/Yellow для него значение Ct отсутствует, а по каналу ROX/Orange для него определено значение Ct, не превышающее 31.

Таблица 2.

Оценка результатов исследуемых проб

| | Значение Ct по каналу | | | Результат анализа |
|---|-----------------------|------------|-------------------|---|
| | FAM/Green | JOE/Yellow | ROX/Orange | |
| 1 | Нет | Нет | ≤ 31 | <i>Bacillus anthracis</i> не обнаружена |
| 2 | < 33 | Нет | ≤ 31 (или Нет) | <i>Bacillus anthracis</i> (pXO1+/pXO2-) |
| 3 | < 33 | < 33 | ≤ 31 (или Нет) | <i>Bacillus anthracis</i> (pXO1+/pXO2+) |
| 4 | Нет | <33 | ≤ 31 (или Нет) | <i>Bacillus anthracis</i> (pXO1-/pXO2+) |
| 5 | Нет | Нет | Нет (или > 31) | Проба подлежит повторному анализу с этапа выделения ДНК |

Результаты не подлежат учету:

1. Отсутствие положительного сигнала в пробах с положительными контролями ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
2. Если значение Ct по каналу FAM/Green больше 33, а значение Ct по каналу ROX/Orange не превышает 31, требуется повторить ПЦР и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения Ct на канале FAM/Green менее 33.
3. Если значение Ct на канале JOE/Yellow больше 33, а значение Ct по каналу ROX/Orange не превышает 31, требуется повторить ПЦР и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения Ct на канале JOE/Yellow менее 33.
4. Если в образце отсутствует значение Ct по каналам

FAM/Green и JOE/Yellow, а значение Ct по каналу ROX/Orange более 31 или отсутствует, требуется повторное проведение ПЦР и детекции. В случае если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот.

5. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контрольного образца на канале JOE/Yellow и/или FAM/Green и для отрицательного контроля ПЦР (ДНК-буфер) на любом из каналов свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Bacillus anthracis-FRT*» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38), в адрес предприятий-изготовителей: ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-39-39, факс (495) 305-54-23), ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (410005. г. Саратов, ул. Университетская, д.46, тел (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 105-0554, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора



В.И. Покровский

Директор ФГУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института «Микроб»
Роспотребнадзора



В.В. Кутырев

Руководитель приемочных технических
и медицинских испытаний
Зав. лабораторией препаратов против чумы
и других особо опасных инфекций
ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора

Л.В.Сяyина