

Г
о

И

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.Кузубов

«10» февраля 2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации ДНК
возбудителя сибирской язвы методом полимеразной цепной реакции
в реальном времени (ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ)
по ТУ 9398-023-46395995-2013»**

2015

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя сибирской язвы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ) по ТУ 9398-023-46395995-2013».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) ДНК возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) в биологическом материале - кровь, содержимое везикул, отделяемое карбункула или язвы, струпья, мокрота, спинномозговая жидкость, моча, испражнения, экссудаты, кусочки органов, а также в материале от животных, продовольственном сырье и продуктах животного происхождения, объектах окружающей среды - почва, трава, фураж, подстилка, вода и т.д., а также культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфической патологии (сибирская язва) при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА), в объектах окружающей среды; как ускоренного предварительного теста при выполнении биологического метода исследования и идентификации подозрительных культур; для эпидемиологического мониторинга.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика сибиреязвенной инфекции, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, в лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии и противочумных учреждениях Роспотребнадзора, в эпидемиологических службах, а также в стационарных и мо-

бильных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства обороны.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 5 реагентов.

№	Состав набора	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-СЯ	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-СЯ	сухое вещество белого цвета	2 мг	3 пробирки
4.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
5.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В	сухое вещество белого цвета	2 мг	1 пробирка

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках (лиофилизованная), РС-СЯ, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимоллярная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, восемь олигонуклеотидных праймеров, четыре флуоресцентных зонда, фермент Taq ДНК-полимераза, синтетическая ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК), трегалоза.

Разбавитель, РБ, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ПЦР-буфер, хлорид магния, глицерол, вода для ПЦР.

Положительный контрольный образец (лиофилизированный), ПКО-СЯ, расфасован в три пробирки из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованные в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: смесь четырех рекомбинантных плазмид pGem-T, три из кото-

рых содержат встроенные специфические последовательности ДНК возбудителя сибирской язвы: фрагмент хромосомного локуса *ssr* или фрагмент гена *lef* на плазмиде рХО1 или фрагмент гена *capA* на плазмиде рХО2 и четвертая – специфический фрагмент контрольной ДНК.

Раствор для разбавления ПКО, **ОКО**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ТЕ буфер.

Внутренний положительный контроль выделения, **ВПК-В** (лиофилизированный), расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с закручивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: рекомбинантная плазида рGem-T со встроенным специфическим фрагментом ДНК.

Примечание: ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 60 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 48 определений, включая контрольные образцы.

2.3 Метод исследования

Обнаружение специфических фрагментов нуклеиновых кислот возбудителя сибирской язвы основано на использовании метода мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени - ПЦР-РВ.

При амплификации методом ПЦР-РВ используются шесть олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих специфические фрагменты ДНК возбудителя сибирской язвы, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующие ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также

четыре флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени. Постановка ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), CFX-96 (BioRad, США), или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси три специфических последовательности ДНК возбудителя сибирской язвы: хромосомный локус *ssp* - по каналу флуоресценции **R6G**, фрагмент гена *lef* на плазмиде рХО1 – по каналу **FAM**, фрагмент гена *capA* на плазмиде рХО2 – по каналу **ROX**, а также внутренний положительный контроль - по каналу **Cy5**.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит ДНК возбудителя сибирской язвы. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит ДНК возбудителя сибирской язвы.

2.3 Ограничения метода

В инфицированном материале ДНК *Bacillus anthracis* может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20 %.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР-РВ (п. 7.5 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность выделения ДНК. Ложно-

отрицательный результат выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца и ПЦР-РВ (п. 7.5 настоящей инструкции).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность – не более $1,0 \cdot 10^3$ копий ДНК в миллилитре пробы (копий·мл⁻¹). Данный показатель достижим при условии отбора для выделения ДНК аликвоты исходного материала (пробы) объемом не менее 100 мкл.

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов ДНК *Bacillus anthracis* (3 заведомо положительных образца), ДНК близкородственных бацилл *B.cereus*, *B.thuringiensis*, *B.megaterium*, *B.subtilis*, а также ДНК гетерологичных видов *Y.pestis*, *B.mallei*, *B.pseudomallei*, *V.cholerae*, *F.tularensis*, *E.coli*. (12 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность - при исследовании 148 проб бактериальных суспензий культур микроорганизмов и 72 проб биологического материала и объектов окружающей среды (220 положительных проб) содержащих *B. anthracis* в концентрации $1,0 \cdot 10^3$ м.к./мл положительный результат получен в 220 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 %.

Диагностическая специфичность – при исследовании 72 отрицательных образцов, содержащих другие виды бацилл (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracoides*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*,

Bacillus megaterium) в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^3$ м.к./мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 72 случаях. Диагностическая специфичность – не менее 96 % с доверительной вероятностью 90%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 «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», МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы».

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалиста с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА I-II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}}$ (№1 – 490нм/520нм, №2 – 525нм/550нм, №3 – 550нм/580нм, №4 – 630нм/665нм), например, «АНК-32 (32М, 48)», CFX-96.

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл и на 20-200 мкл;

штатив-карусель для данных пипеток.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);

микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903»);

штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;

штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ЗАО Синтол);

холодильник на 2-8 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

ТЕ-буфер (кат. номер В-014, ЗАО «Синтол»);

набор реагентов для выделения ДНК/РНК;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Исследованию подлежат препараты нуклеиновых кислот, приготовленные (согласно СП 3.1.7.2629 -10 «Профилактика сибирской язвы») из следующего материала: содержимое везикул, отделяемое карбункула или язвы, струпья, мокрота, кровь, спинномозговая жидкость, моча, испражнения, экссудаты - от больных или подозрительных на заболевание людей, в зависимости от формы заболевания; трупный материал - кровь, экссудаты, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов и другие); материал от животных; продовольственное сырье и продукты животного происхождения; объекты окружающей среды (почва, трава, фураж, подстилка, вода и другие).

6.2 Процедура получения и предварительной подготовки биологического материала и проб из объектов окружающей среды

Все работы по забору проб клинического и секционного материала от людей и животных, из объектов окружающей среды осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)", МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы».

6.2.1 Взятие материала от животных

Микробиоптат/микроаутоптат (пунктат) помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками.

Макробиоптат/макроаутоптат (кусочки тканей массой 0,1 - 1,0 г) помещают в контейнер с завинчивающейся крышкой.

6.2.2 Взятие материала от человека

Забор крови проводят из локтевой вены в объеме 3 - 5 мл. Кровь аккуратно (без образования пены) переносят в стерильную пробирку, содержащую 6 %-ный раствор ЭДТА в отношении 1:20 к объему крови. Используют одноразовые шприцы, иглы и посуду.

Содержимое везикул, карбункулов в объеме 0,1 - 0,3 мл и фрагменты струпов массой 10 - 100 мг помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками, содержащие 0,1 - 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого или транспортной среды.

Мазки из полости носа берут сухими стерильными ватными тампонами на зондах, как и для бактериологического исследования, с той разницей, что тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой с транспортной средой.

Спинальную жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Предварительная обработка проб не требуется.

Мокроту отбирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл. В емкость добавляют «Инактивирующий реагент А» (РУ № ФСР2012/13128 от 01 марта 2012 года).

К образцам мокроты в 50 мл пробирках или контейнерах необходимо добавляют инактивирующий реагент А в пропорции 1:1, но не менее 1 мл. Содержимое пробирки перемешивают до полной гомогенизации. Инкубируют при комнатной температуре в течение как минимум 0,5-1 часа для инактивации.

Примечание: инактивированные образцы стабильны при температуре плюс 20-25 °С в течение 4 суток, при температуре плюс 4-8 °С в течение 30 суток. Одноразовой пастеровской пипеткой отбирают 1 мл инактивированного разжиженного образца в 1,5 мл чистую пробирку. Центрифугируют 5 минут при 10 000 об·мин⁻¹ и немедленно после

центрифугирования удаляют супернатант путем аспирации либо одноразовой пастеровской пипеткой, либо пипеткой с чистым одноразовым наконечником. Остаточный объем супернатанта должен составлять не более 0,2 мл.

Мочу (первую утреннюю порцию) отбирают в количестве не менее 20 - 30 мл в специальный сухой стерильный флакон. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют в течение 10 минут при $10000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Испражнения отбирают в объеме 1 - 3 г. К испражнениям добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого в соотношении 1:9, тщательно ресуспендируют с использованием микроцентрифуги-встряхивателя. Отбирают по 1 мл в микроцентрифужные пробирки. Пробирки центрифугируют при $9000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 5 мин. Затем отбирают по 0,2 мл верхней бело-желтой части осадка (если отсутствует бело-желтый пограничный слой или полностью осадок, то отбор производят на границе осадка и супернатанта или со дна пробирки, соответственно) и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой. Пробирки центрифугируют при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого.

6.2.3 Взятие материала из сырья животного происхождения и объектов окружающей среды

Мясо и мясные продукты

Из материала, доставленного на исследование, отбирают образцы весом 10 - 30 г, из мяса - участки с лимфоидной тканью или кровоизлияниями. Кусочки органов или мяса массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение

15 мин при 12000 об·мин⁻¹, осадок суспендируют в ТЕ-буфере или 0,9 % растворе натрия хлористого и используют для выделения ДНК.

Шерсть

Шерсть для исследования отбирают из разных мест, не менее 5 образцов массой около 2 г каждый (лучше брать пучки загрязненной шерсти). Если шерсть упакована в кипы, берут не менее 10 образцов из разных мест каждой кипы, а также скопившуюся внутри обшивки пыль. Образцы от одной кипы объединяют и упаковывают вместе. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого в соотношении 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⁻¹, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об·мин⁻¹. Осадок суспендируют в 0,2-0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлористого.

Кожа и кожсырье

Берут кусочки кожи размером 3 x 3 см с периферических незагнивших и незаплесневевших участков шкурок. При наличии на внутренней стороне шкурки кровоподтеков или инфильтратов пробы берут и в этих местах. Образцы кожи измельчают ножницами и помещают в пробирку, добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого в соотношении 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин. Дальнейшую подготовку проб осуществляют также как при подготовке проб шерсти.

Почва

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения спорами возбудителя (мест вынужденного убоя скота, стоянок и водопоя животных) берут на глубине до 15 см, на территории скотомогильников - на глубине до 2 м с помощью почвенных буров. При этом при заборе проб с большой территории обследуемую площадь разбивают на квадратные участки со стороной не более 4 м. В каждом квадрате намечают 5 точек по диагонали или 4 точки по краям и одну посередине, откуда производят отбор проб почвенным буром. Перед взятием почвы на

территории скотомогильника верхний ее слой снимают на 2 - 3 см и пробы берут на глубине до 1,5 - 2,0 м через каждые 25 см не менее 200 г в пробе. Особое внимание обращают на костные и другие животные остатки, которые также отбираются для исследования.

К пробам почвы массой 20-30 г добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого в соотношении 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Дальнейшую подготовку проб осуществляют также как при подготовке проб шерсти.

Вода

Пробы воды из естественных и искусственных водоемов берут у поверхности (на глубине 10 - 15 см) и у дна при помощи батометра или специально приспособленной бутылки. Объем каждой пробы не менее 0,5 л, общий объем не менее 1 л. Кроме того, берут пробы придонного осадка у береговой кромки, которые исследуют так же, как пробы почвы.

Для концентрирования бактериальных клеток используют либо дробное центрифугирование, либо вакуумную фильтрацию.

Для дробного центрифугирования переносят по 35 мл из исследуемой пробы воды в 12 центрифужных пробирок объемом 50 мл с винтовой горловинной крышкой типа Falcon и центрифугируют при $10000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 10 мин. Удаляют надосадочную жидкость, осадок в каждой пробирке ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Из центрифужных пробирок переносят полученную суспензию в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой и центрифугируют при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 1 мин. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Для исследования отбирают по 100 мкл в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

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 предва-

рительно фильтруют через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр. После окончания фильтрации мембранные фильтры помещают обожженным анатомическим пинцетом в стерильный флакон или чашку Петри, или стерильный пластиковый пакет типа «Вихрь» объемом 100 мл и вносят 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. Фильтр, помещенный в чашку Петри, разрезают на мелкие куски ножницами, инкубируют при покачивании в течение 10 мин. Полученную суспензию (смыв с фильтра) переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1,0 мл в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой и центрифугируют при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Смывы с объектов внешней среды

Смывы делают с мест наиболее вероятного обсеменения спорами возбудителя с помощью стерильного тампона, смоченного стерильной дистиллированной водой. Площадь смыва одним тампоном около 100 кв. см. Затем тампоны помещают в пробирки, заливают стерильной дистиллированной водой (15 мл) и закрывают пробкой. Полученный материал центрифугируют при $10000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ и осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого.

Корма

Концентрированные корма (зерно, отруби, комбикорм) отбирают в зависимости от условий хранения. При наличии незатаренных кормов первичные пробы отбирают из расчета 1 проба не менее 400 г на 4 кв. м. поверхности, но не менее 5 проб от каждого закрома, партии. Первичные пробы берут как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма равномерно по всей площади. При наличии затаренных кормов отбор проводят от каждой упаковочной единицы. Отбор проб проводят сухим стерильным пробным щупом. После взятия проб от каждого объекта (партии) щуп очищают и обжигают огнем паяльной лампы.

Пробы грубых кормов (сено, солома) берут из разных мест скирды при помощи ножниц и пинцета из расчета 1 проба (40 г) на 4 кв. м. площади скирды. Зеленую массу отбирают как грубые корма. Корнеплоды в зависимости от величины отбирают из расчета 1 - 3 штуки на 4 кв. м. площади бурта, отсека. С отобранных корнеплодов скальпелем в местах, где имеются остатки земли, срезают поверхностный слой, который используют для исследования.

В лабораторию направляют среднюю пробу, которую составляют из хорошо перемешанных первичных проб данной партии, емкости и т.п. Масса средней пробы должна быть не менее 500 г.

Подготовку проб кормов осуществляют аналогично как пробы почвы.

Воздух

Пробы воздуха отбирают с помощью специальных приборов, снаряженных сорбирующей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 3 - 5 куб. м.

Чистые культуры микроорганизмов

Из культур сибирезвеного микроба или подозрительных изолятов готовят суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует 2×10^8 м.к./мл для *B. anthracis*. Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации $1,0 \cdot 10^5 - 1,0 \cdot 10^3$ м.к./мл.

6.3 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

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.

С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды следующего состава: сахараза 0,218 моль, K_2HPO_4 0,0038 моль, K_2HPO_4 0,0072 моль; БСА 1 %. При необходимости длительного хранения и (или) транспортирования, при отсутствии низкотемпературных холодильников, используют специальную транспортную среду ESP: саркозил 1 %; ЭДТА 0,05 моль; проназа Е 1 мг/мл. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при температуре от плюс 20 до плюс 30 °С в темном месте до 10 дней.

6.4 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие возбудителя сибирской язвы, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118 – 13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10).

6.5 Обеззараживание проб

Обеззараживание проб проводят 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».

1. Предварительно подготовленный исследуемый материал (по п. 6.2.) в количестве 0,1 мл засевают в пробирки с 0,9 мл бульона Brain-Heart или буль-

он Хоттингера (рН 7,2) и инкубируют с аэрацией в термостате или термостате-шейкере при температуре 37 °С в течение 2,5 часов.

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

3. Из пробирок отбирают по 1,0 мл и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и прогревают при температуре (100 ± 1) °С в течение 10 минут.

4. Затем отбирают по 100 мкл в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и вносят соответствующее количество лизирующего раствора, содержащего 6 М гуанидинизотиоцианата, и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С.

6.6. Выделение ДНК

Для выделения НК используют зарегистрированные наборы реагентов сообразно происхождению проб. Для достижения показателей чувствительности объем аликвоты исходного материала (пробы) должен составлять не менее 100 мкл. Полученный препарат НК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ».

Для определения возможной контаминации на этапе выделения ДНК в каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом включают отрицательный контроль выделения (**ОКО-В**), который анализируют далее в ПЦР-РВ.

Для определения эффективности выделения ДНК из исследуемого материала в каждую пробу на этапе ее подготовки к анализу добавляют внутренний положительный контроль выделения (**ВПК-В**) из состава набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ». Для его приготовления в пробирку с сухим содержимым **ВПК-В** вносят 200 мкл элюента из состава наборов реагентов для выделения, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Полученный раствор **ВПК-В**

добавляют по 10 мкл во все пробирки с исследуемыми образцами после их обеззараживания и в пробирку с ОКО-В.

При применении на этапе пробоподготовки наборов производства ЗАО «Синтол» добавления **ВПК-В** для контроля выделения нуклеиновых кислот не требуется, поскольку он входит в состав лизирующего компонента.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления положительного контрольного образца

В пробирку с сухим содержимым **ПКО-СЯ** из набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» добавляют 200 мкл **ОКО**, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов **ПКО-СЯ** допускается при температуре не выше минус 20 °С не более месяца.

7.2 Разведение препарата ДНК (при необходимости)

Для выявления и идентификации ДНК возбудителя сибирской язвы необходимо внести в реакцию 20 мкл препарата ДНК. В случае необходимости, раствор препарата ДНК разводят с помощью ТЕ-буфера.

7.3. Проведение ПЦР

Расход каждого реагента

На одну постановку ПЦР требуется:

1 пробирка - для **ОКО**;

1 пробирка - для **ОКО-В**;

1 пробирка - для **ПКО-СЯ**;

необходимое количество пробирок по числу **исследуемых образцов**.

На каждый анализ расходуется:

- 20 мкл **ПКО-СЯ**;

- 20 мкл **ОКО**.

7.3.1 Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводится в один этап:

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией

по эксплуатации;

- вводят согласно таблице 1 в диалоговый интерфейс программы прибора параметры температурно-временного режима ПЦР-РВ и вводят красители **FAM, R6G, ROX** и **Cy5**;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °С – 300 секунд	1
2	60 °С – 40 секунд Считывание сигнала флуоресценции	50
3	95 °С – 15 секунд	

- вводят сведения об образцах по соответствующему красителю (при использовании прибора АНК32, 32М или 48 ввод сведений об образцах возможен после запуска программы амплификации) и активируют прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации;

- набор реагентов извлекают из холодильника, **РБ, ОКО** перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;

- устанавливают необходимое количество микропробирок с реакционной смесью **РС-СЯ** в штатив (соответствует числу исследуемых проб плюс три для контролей: **ПКО, ОКО, ОКО-В**) и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке либо на крышке пробирки (в зависимости от прибора);

- открывают крышки микропробирок и вносят в них по 15 мкл **РБ**;

- используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в микропробирки по 20 мкл **ОКО, ОКО-В** и далее по 20 мкл растворов **исследуемых образцов**, в необходимой повторности*, закрывают крышки данных микропробирок;

- вносят в микропробирки в соответствии с маркировкой по 20 мкл **ПКО-СЯ**, закрывают крышки данных микропробирок;

- перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Помещают микропробирки в при-

бор для ПЦР-РВ в соответствии с таблицей 2 и прикатывают крышки микропробирок.

Таблица 2. Порядок исследования образцов

№ ячейки	Образец
1	ПКО
2	ОКО
3	ОКО-В
4	исследуемый образец 1
5	исследуемый образец 1
6	исследуемый образец 2
7	исследуемый образец 2
8	

- закрывают крышку прибора, запускают реакцию ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора (расчетное время анализа составляет около 2-х часов).

*Примечание: каждый образец рекомендуется анализировать в двух повторях..

7.4 Процедура измерения результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», CFX-96 или эквивалентных им (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции (регистрация роста сигнала) означает любую величину порогового цикла C_t менее 50. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается программой прибора, например, как величина порогового цикла ($C_t \geq 50$ в приборах АНК), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы BioRad) и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналам FAM, R6G и ROX относительно отрицательного контроля свидетельствует о наличии специфических фрагментов ДНК возбудителя сибирской язвы в данной микропробирке.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Sy5** в случае отсутствия сигнала по каналам **FAM**, **R6G** и **ROX** свидетельствует об успешном прохождении реакции ПЦР-РВ и подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК *Bacillus anthracis* в данной микропробирке.

7.5 Учет результатов реакции

7.5.1. Оценка амплификации ВПК-В

Регистрация в пробирке с ОКО-В роста сигнала флуоресценции по каналу **Sy5** с пороговым циклом **Ct** менее 31,0 свидетельствует об успешном выделении ДНК внутреннего положительного контроля в пробирке ОКО-В (рисунок 1).

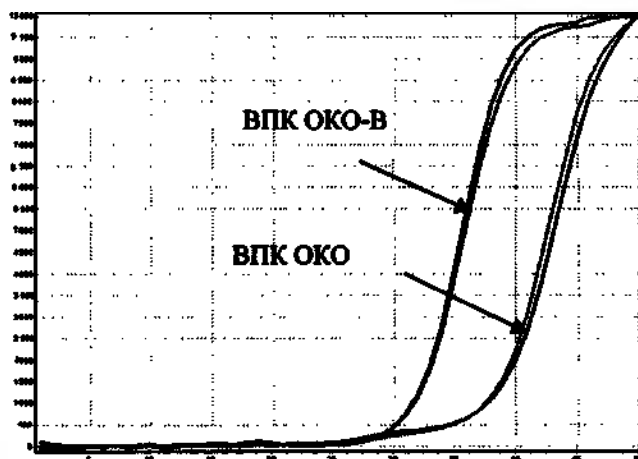


Рисунок 1 – Результат реакции ПЦР-РВ (канал **Sy5**) для пробирок с ОКО-В, в которые было добавлено 10 мкл раствора ВПК-В, а затем проведено выделение (кинетические кривые ВПК ОКО-В) и пробирок с ОКО (содержащих ВПК), в которые не добавлялась ДНК ВПК-В и с которыми не проводили выделение (кинетические кривые ВПК ОКО).

Регистрация в пробирках с исследуемыми образцами роста сигнала флуоресценции по каналу **Sy5** **вне зависимости** от порогового цикла при наличии положительного результата по каналу **R6G** свидетельствует об успешном выделении ДНК в пробирках с исследуемыми образцами.

Допускается отсутствие регистрации сигнала по каналу **Sy5** в пробирках, где отмечена флуоресценция по каналам **FAM**, **R6G**, **ROX** с пороговым циклом реакции менее 30,0.

Рост сигнала флуоресценции по каналу Cy5 в случае отсутствия роста сигнала флуоресценции по другим каналам подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК *Bacillus anthracis*.

7.5.2 Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с **ОКО (ОКО-В)** по любому из каналов **FAM, R6G, ROX** (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с **ПКО-СЯ** по любому из каналов **FAM, R6G, ROX** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала по каналу **Cy5** (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

7.5.3 Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с **ОКО (ОКО-В)** по каналам **FAM, R6G, ROX** одновременно с наличием сигнала по каналу **Cy5**;
- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с **ПКО-СЯ** по каналам **FAM, R6G** и **ROX**, с любой величиной порогового цикла Ct;
- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с **исследуемым образцом** по каналу **Cy5** с любой величиной порогового цикла при наличии или отсутствии сигнала флуоресценции по каналам **FAM, R6G, ROX**.

Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с **исследуемым образцом** по каналам **R6G** и **FAM** и/или **ROX** свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК *Bacillus anthracis*. Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения.

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице 3.

Таблица 3 – Интерпретация результатов анализа с использованием Набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ»

Образец	Результат ПЦР по каналу флуоресценции				Интерпретация результата
	R6G	FAM	ROX	Cy5	
	ssp (хромосома)	lef (pXO1)	capA (pXO2)	ВПК	
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев					
ПКО	–	–	–	–	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
ОКО-В	Положительный результат по любому из каналов			любой	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения ДНК
ОКО					Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы					
проба	–	–	–	–	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов					
ПКО	+	+	+	любой	Набор реагентов специфичен в отношении ДНК возбудителя сибирской язвы
ОКО	–	–	–	+	Контаминация отсутствует
ОКО-В	–	–	–	Ct≤31,0	Контаминация отсутствует Набор для выделения ДНК работоспособен
проба	+	+	+	любой	В пробе содержится ДНК <i>B. anthracis</i> (pXO1+, pXO2+).
	+	+	–	любой	В пробе содержится ДНК <i>B. anthracis</i> (pXO1+, pXO2–).
	+	–	+	любой	В пробе содержится ДНК <i>B. anthracis</i> (pXO1–, pXO2+).
	+	–	–	любой	В пробе содержится ДНК <i>B. anthracis</i> (pXO1–, pXO2–).
	–	–	–	Ct≤31,0	В пробе отсутствует ДНК сибиреязвенного микроба.
	–	+	–	+	В пробе не обнаружена ДНК <i>B. anthracis</i> . Выявлен ген <i>lef</i> плазмиды pXO1 сибиреязвенного микроба. Необходимо повторить анализ данной пробы.
	–	–	+	+	В пробе не обнаружена ДНК <i>B. anthracis</i> . Выявлен ген <i>capA</i> плазмиды pXO2 сибиреязвенного микроба. Необходимо повторить анализ данной пробы.
	–	+	+	+	В пробе не обнаружена ДНК <i>B. anthracis</i> . Выявлены гены <i>lef</i> и <i>capA</i> плазмид pXO1 и pXO2 сибиреязвенного микроба. Необходимо повторить анализ данной пробы

8. РАСЧЕТЫ

8.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например программа АНК_Shell версия 33 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М», «АНК-48» или Bio-Rad CFX Manager 2.0 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 9398-023-46395995-2013 – в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

9.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-023-46395995-2013 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до плюс 20 °С.

9.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Срок годности разведенных препаратов **ПКО-СЯ** не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

9.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» направлять на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495) 984-69-93, факс. (499) 977-74-55 E.mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Директор ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора академик РАН, д.м.н., профессор



В.В. Кутырев

Пронито, пронумеровано,
проброшкоровано 26 листов

Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.В. Кузубов

