



УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ООО «Ветбиохим»  
А.В. Кривонос  
\_\_\_\_\_ 2018 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы для идентификации бактерий вида *Bacillus anthracis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)  
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

### I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для идентификации бактерий вида *Bacillus anthracis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.2 Тест-система включает три набора, рассчитанных на проведение 50 анализов включая контрольные образцы (таблица 1):

Таблица 1

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I - для выделения ДНК			
1	Буфер выделения	6,0 мл	1 флакон
2	Буфер гомогенизации	30,0 мл	1 флакон
Набор II - для выявления ДНК <i>B. anthracis</i> методом ПЦР			
1	Taq-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	Праймеры для ПЦР <i>B. anthracis</i>	0,27 мл	1 пробирка
3	Положительный контроль ДНК <i>B. anthracis</i>	0,03 мл	1 пробирка
4	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка
5	Вода деионизованная	2,0 мл	1 пробирка
6	Минеральное масло	5,0 мл	1 флакон
Набор III - для электрофореза (на 5 гелей по 10 образцов)			
1	Агароза	5 г	1 пакет
2	Концентрат буфера для электрофореза	20,0 мл	1 флакон
3	Бромистый этидий	0,15 мл	1 пробирка

Тест-система на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) предназначена для выявления и идентификации бактерий вида *Bacillus anthracis* (возбудитель сибирской язвы), содержащих ген капсулообразования (Cap B). Данная тест-система позволяет обнаружить капсулообразующие бактерии *Bacillus anthracis* в вегетативной форме в микробиологических культурах и жидких пробах из объектов окружающей среды, а также в материале от больных и павших животных (кровь, фрагменты селезенки, сердца, печени).

#### 1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл и 13 мл, пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

Наборы I, II и III отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. Отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. На каждый пакет с компонентами наборов наклеена этикетка с указанием организации-производителя и/или товарного знака, наименования набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения.

Наборы I и III, упакованные в пластиковые пакеты, вложены в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены типографским способом следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя, полное наименование тест-системы, количество анализов, номер серии и контроля, дата изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение ТУ, надпись «Для ветеринарного применения». В каждую упаковку вложена инструкция по применению тест-системы.

#### 1.4 Условия хранения и транспортирования

Наборы I и III необходимо хранить при температуре от 2°C до 25°C, Набор II – при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

Транспортирование Набора I и III проводить при температуре от 2°C до 25°C. Набор II транспортировать при температуре от 2°C до 6°C (во льду) в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-системы необходимо разукмплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления. Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов проводят, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20- 24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т или аналогичные.

## II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Идентификация бактерий вида *Bacillus anthracis* основана на обнаружении и амплификации фрагмента гена капсулообразования *CapB* с помощью полимеразной цепной реакции, которая представляет собой многократное цикличное повторение трех процессов:

- тепловая денатурация ДНК в исследуемой пробе;
- гибридизация (“отжиг”) исследуемой ДНК со специфическими олигонуклеотидными зондами (праймерами);
- синтез комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК- полимеразы.

Результаты электрофореза являются основанием для заключения о наличии или отсутствии возбудителя сибирской язвы в исследуемом образце.

## III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

При выполнении исследований следует соблюдать условия и требования МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### 3.1 Подготовка к работе

#### 3.1.1 Необходимые условия успешного проведения анализа

Строго соблюдать условия хранения и транспортирования компонентов тест-системы (см. п. 1.4).

Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.

На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромовой смесью, отмыта, стерилизована.

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять центрифугированием.

При открывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т. п.).

**Бромистый этидий разлагается на свету и при нагревании. Содержащие его растворы хранить в темном месте.** При длительном хранении или многократном нагревании в них перед употреблением следует внести свежую порцию бромистого этидия (5 мкл на 100 мл буфера).

### 3.2 Подготовка исследуемого материала и выделение ДНК.

Подготовку образцов проводят в изолирующем боксе, в условиях работы с микроорганизмами II группы опасности. Все операции выполняют стерильными инструментами с использованием стерильной, химически чистой стеклянной и одноразовой пластиковой посуды.

До начала работы промаркировать чистые полипропиленовые пробирки на 1,5-2,0 мл. В пробирки, предназначенные для исследования подготовленных проб крови и органов, внести по

100 мкл буфера выделения. После этого приступить к работе с инфицированным материалом. Работу с образцами проводить с помощью одноразовых наконечников с аэрозольным барьером (фильтром), для каждой пробы использовать отдельный наконечник!

**Примечание:** чтобы избежать самопроизвольного открывания пробирок при нагревании, следует придавить их сверху грузом или использовать специальные пробирки с защелкой.

**3.2.1 КРОВЬ:** пробы цельной крови должны быть обязательно консервированы 3-6%-ным раствором ЭДТА или 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 1:20. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Пробирки с цельной кровью смешанной с антикоагулянтом хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови.

- Пробы крови в объеме 100 мкл внести в подготовленные пробирки со 100 мкл буфера выделения, прогреть 20 мин при 100°C в термостате типа «Гном» («ДНК-Технология», Россия) или на водяной бане.

- Центрифугировать прогретые пробы 5 мин в настольной центрифуге типа “Эппендорф” при 10000 об/мин.

- Отобрать надосадочную жидкость в предварительно маркированные одноразовые полипропиленовые пробирки. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК и предназначена для проведения ПЦР.

**3.2.2 ОРГАНЫ:** кусочки селезенки, лимфоузлов, сердца весом, примерно по 0,5 г - растереть с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера или в фарфоровой ступке и гомогенизировать в 0,5 мл буфера гомогенизации. **Примечание:** перед применением буфер гомогенизации встряхнуть до однородного состояния.

- Гомогенат осветлить центрифугированием в настольной центрифуге типа “Эппендорф” при 5000 об/мин в течение 5-10 мин.

- Внести 100 мкл надосадочной жидкости в предварительно подготовленные пробирки, содержащие по 100 мкл буфера выделения, прогреть 20 мин при 100°C в термостате типа «Гном» («ДНК-Технология», Россия) или на водяной бане.

- Центрифугировать прогретые пробы 5 мин в настольной центрифуге типа “Эппендорф” при 10000 об/мин.

- Отобрать надосадочную жидкость в предварительно маркированные одноразовые полипропиленовые пробирки. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК и предназначена для проведения ПЦР.

**3.2.3 ЖИДКИЕ ПРОБЫ** (вода из водоемов, сточная, питьевая, суспензии бактерий, смывы):

- Пробы в объеме 1 мл поместить в маркированные полипропиленовые пробирки объемом 1,5-2,0 мл и центрифугировать 5 мин в настольной центрифуге типа “Эппендорф” при 10000 об/мин.

- Надосадочную жидкость осторожно удалить.

- К осадку добавить 100 мкл буфера выделения, суспендировать пробы на смесителе типа «Vortex».

- Суспендированные пробы прогреть 20 минут при 100°C в термостате типа «Гном» («ДНК-Технология», Россия) или на водяной бане.

- Центрифугировать пробы в течение 1 минуты при 10000 об/мин.

- Отобрать надосадочную жидкость в предварительно маркированные одноразовые полипропиленовые пробирки. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК и предназначена для проведения ПЦР.

Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных ДНК-проб. **Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6°C не более 15 минут.** При необходимости выделенную ДНК хранить при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 7 суток, не допуская многократного размораживания.

- **КОНТРОЛИ** – на этапе проведения ПЦР (п.3.3) использовать положительный и отрицательный контроли. Рекомендуется использовать по одному положительному и одному отрицательному контролю на каждые 8 исследуемых проб. Положительным контролем (К+) служит рекомбинантная (плазмидная) ДНК *B. anthracis*, в ПЦР использовать 5 мкл положительного кон-

троля. **Положительный контроль ДНК *V. anthracis* хранить при температуре от минус 18°C до минус 20°C**, пробирку с положительным контролем размораживать непосредственно перед постановкой ПЦР.

В качестве отрицательного контроля использовать 5 мкл деионизованной воды.

### 3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения ПЦР использовать **Набор II - для выявления ДНК *V. anthracis* методом ПЦР**.

Отобрать и маркировать необходимое количество пробирок с учетом положительных («К+») и отрицательных («К-») контролей.

В отдельной пробирке приготовить общую реакционную смесь на n+1 проб (n – количество проб с учетом положительных и отрицательных контролей). Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 2. Все реактивы **кроме Таq-полимеразы** должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Перед открыванием пробирок рекомендуется осадить капли со стенок и крышек кратким центрифугированием (5-10 сек). Таq-полимеразу добавить в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать ее во льду, нагревание не допускается.

Таблица 2

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР <i>V. anthracis</i>	4,5	4,5 x (n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Смесь перемешать пипетированием избегая образования пены и немедленно внести по 20 мкл в маркированные пробирки. В каждую пробирку добавить по 2-3 капли минерального масла (примерно 40 мкл).

В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести под слой масла по 5 мкл проб и контролей в следующей последовательности:

- 1) В пробирку, маркированную «К - » внести 5 мкл деионизованной воды;
- 2) В соответствующие пробирки внести по 5 мкл исследуемых проб;
- 3) В пробирку, маркированную «К+ » внести 5 мкл положительного контроля.

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером (фильтром).

Запустить на амплификаторе программу:

94°C – 5 мин – 1 цикл

94°C – 30 сек  
50°C – 30 сек  
72°C – 30 сек } 30 циклов

72°C - 5 мин – 1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 94°C (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Пробы, полученные после проведения ПЦР, можно хранить в течение 24 часов при комнатной температуре, в течение 72 часов при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

## IV УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Результаты исследования следует учитывать путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в агарозном геле, используя **Набор III - для проведения электрофореза**.

**4.1 Приготовление 1 л рабочего буфера для электрофореза:** к 980 мл дистиллированной воды добавить 20 мл концентрата буфера для электрофореза и 40 мкл бромистого этидия.

Буфер можно приготовить самостоятельно по следующей прописи: навеску 4,04 г Триса растворить в 200 мл дистиллированной воды, добавить 1,14 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл 0,5 М раствора ЭДТА pH 8,0 и довести объём буфера до 1000 мл дистиллированной водой. После растворения компонентов буфера добавить 40 мкл раствора бромистого этидия.

#### 4.2 Приготовление агарозного геля

В колбу из термостойкого стекла насыпать 2 г агарозы и добавить 100 мл рабочего буфера для электрофореза (п.4.1), перемешать вращением колбы и поместить в микроволновую печь или на водяную баню, нагревать до полного расплавления агарозы. Расплавленную агарозу охладить до 45-55°C, осторожно вращая колбу. Охлажденную агарозу залить в специальную форму, установить гребенки, не касаясь дна формы. Расстояние между гребёнками должно быть не менее 4 см, толщина геля около 0,5 см. После полного застывания геля гребёнки аккуратно вынуть, подложку с готовым гелем перенести в аппарат для горизонтального электрофореза (например, ПГ-9 «Диа - М», Россия), залить рабочим буфером для электрофореза, что бы он полностью покрывал всю поверхность геля. Гель должен располагаться лунками ближе к отрицательному электроду.

#### 4.3 Электрофорез продуктов амплификации

Выставить в штатив пробирки с полученными пробами после проведения ПЦР (п. 3.3). Из каждой пробирки, из-под слоя масла, аккуратно отобрать 10 мкл амплификационной смеси и последовательно внести в лунки геля. Амплификационная смесь уже содержит краситель. Дополнительное смешивание амплификационной смеси с красителем не требуется. Каждой пробирке соответствует одна лунка геля. В каждом ряду лунок обязательно должен присутствовать положительный контроль («К+»).

Электрофорез проводить при напряжении 8-10 В/см длины геля. **Краситель должен пройти не менее половины длины геля. Направление движения образцов в геле от “-” к “+”!**

#### 4.4 Учет результатов электрофореза

Результаты электрофореза просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор". Результаты реакции выявляются в виде светящихся красноватых полос.

Положительными следует считать пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительного контроля. В отрицательном контроле не должно выявляться никаких полос.

Исследуемые пробы следует считать отрицательными, если в них не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта). Размер фрагментов после проведения ПЦР – **300 п.н.**

Присутствие в отрицательном контроле окрашенных фрагментов на уровне полос положительного контроля свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. Результаты аннулируются. Анализ необходимо провести заново, начиная с этапа выделения ДНК, приняв меры для ликвидации контаминации.

## V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Бромистый этидий является мутагеном, проникающим через кожу. При работе с ним использовать резиновые или латексные перчатки.

5.2 Ультрафиолет вызывает ожоги кожи и слизистой оболочки глаз. При просмотре гелей пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5.3 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. Работать необходимо в перчатках. При случайном попадании компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16.