

«УТВЕРЖДАЮ»

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




В.Г. Акимкин

« 13 » ноября 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «МТБ-ДИФ» для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза *M. bovis* и *M. tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «МТБ-ДИФ» предназначена для выявления и дифференциации ДНК видов микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС) – человеческого (*M.tuberculosis*) и бычьего (*M.bovis*), а также вакцинного штамма (*M.bovis* BCG) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа целесообразно использовать образцы ДНК, в которых с помощью набора «МТБ-КОМ» была обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК возбудителей туберкулеза *M. bovis*, *M.bovis* BCG и *M. tuberculosis* основан на амплификации специфического участка ДНК за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и зондов, меченных

флуоресцентными красителями, и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы.

Реакционная система включает четыре независимые системы для ПЦР (находящиеся в одной реакционной смеси), каждая из которых содержит праймеры и меченые флуоресцентными красителями зонды. С помощью первой, второй и третьей системы идентифицируется последовательность ДНК видов микобактерий туберкулеза. Четвертая представляет собой систему внутреннего неконкурентного контроля (ВК).

Для предотвращения контаминации лабораторного помещения продуктами амплификации (ампликонами), которые могут служить мишенями в последующей ПЦР и давать ложноположительные результаты, на этапе предобработки реакционной смеси в тест-системе используется фермент урацил-ДНК-гликозилаза, UDG. Субстратом для фермента является неканонический, характерный для РНК дезоксиуридинтрифосфат (dUTP) вместо канонического дезокситимидинтрифосфата (dTTP). UDG выщепляет dUTP из ДНК и делает непригодными для ПЦР попавшие в пробирку контаминирующие ампликоны. В то же время с природной матрицы, не содержащей dUTP, начинает нарабатываться специфический продукт (меченый, в свою очередь, dUTP). Нарбатываемый в процессе ПЦР специфический продукт остается интактным, поскольку присутствующий в пробирке **термолабильный** фермент UDG инактивируется при первом шаге ПЦР - нагревании реакционной смеси до 95°C.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

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

Таблица 1

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), м.т./мл	
			<i>M. tuberculosis</i> (штамм H37 Ra)	<i>M.bovis</i> BCG (штамм <i>M.bovis</i> BCG-1, Russia)
Физиологический раствор	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ³	1x10 ³
Моча			5x10 ³	1x10 ³
Физиологический раствор	«ДНК-сорб-В»		1x10 ³	1x10 ³
Моча			5x10 ³	5x10 ³
10% гомогенат разных видов нативной ткани (легкие, лимфатические узлы, почки, печень, мозг, селезенка)	«ДНК-сорб-С-М»		1x10 ³	1x10 ³

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность оценивалась как при тестировании штаммов микобактерий входящих в группу *Mycobacterium tuberculosis* complex, так и нетуберкулезных микобактерий, а также штаммов микроорганизмов, вызывающих заболевания сходных локализаций.

Для определения аналитической специфичности на штаммах различных микроорганизмов (в концентрации не менее чем 5x10⁸ м.т./мл), тестировали 116 контрольных штаммов или клинических изолятов. Из них 5 входили в состав *M.tuberculosis* complex, 31 являлись нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), 80 принадлежали к другим родам и семействам.

Специфичность тест-системы оценивалась по отсутствию положительного результата амплификации ДНК бактерий, не принадлежащих к *M.tuberculosis* complex, а также по наличию положительного результата по соответствующему каналу детекции для дифференцирования видов микобактерий туберкулезного комплекса.

Перечень референтных видов:

- Микобактерии, принадлежащие *Mycobacterium tuberculosis* complex: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG-1 и др.
- Нетуберкулезные микобактерии: *M.avium*, *M.paratuberculosis*, *M.xenopi*, *M.gordonae*, *M.ulcerans*, *M.phlei*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.fortuitum*.
- Бактерии, принадлежащие к другим родам и семействам: *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydomphila*, *Cryptococcus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

Результаты тестирования показали 100% специфичность.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК видов *Mycobacterium tuberculosis* complex с гибридизационно-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-50 F – комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК видов, входящих в *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL MTC-diff	0,28	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК MTC-diff / STI	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,6	1 пробирка
ВКО STI-87	1,0	1 пробирка

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

Реагенты «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

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.

- 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 сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

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

- 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»).
- 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

Взятие исследуемого материала

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», или аналогичный).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл, 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания, или аналогичный).
4. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический

- раствор).
5. ТЕ-буфер.
 6. Стеклянные шарики, стерильные, для гомогенизации образцов тканей или культур микобактерий (D=3 мм).
 7. PBS-буфер.

Предварительная подготовка исследуемого материала

8. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
9. о-Ксилол химически чистый (хч) для депарафинизации парафиновых блоков.
10. Этанол.
11. Стеклянные шарики, стерильные, для гомогенизации образцов тканей или культур микобактерий (D=3 мм).
12. Металлические шарики, стерильные, для гомогенизации образцов тканей с плотной стромой (D=3 мм).
13. Пастеровская пипетка, пластиковая, стерильная (например LAB-Medica, Китай).
14. Чашка Петри, пластиковая, стерильная (например, SPL Lifesciences, Корея).
15. Скальпель хирургический одноразовый (например, Arxmed, Нидерланды).
16. Одноразовые полиэтиленовые пакеты с застежкой Zip-lock (например, «Промсервис», Россия, или аналогичные).
17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл, 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Денситометр для определения мутности бактериальной суспензии (например, Den-1, Biosan, Латвия).
20. Гомогенизатор для тканевых образцов (например, гомогенизатор TissueLyser LT, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) или отдельные для каждой пробы стерильные инструменты (фарфоровые ступки с пестиками, пинцеты, скальпели, ножницы).
21. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»),

- Германия, или аналогичная).
22. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 23. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 25. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

26. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп», «ДНК-сорб-С-М».
27. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к соответствующему комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

28. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками или планшеты на 96 лунок (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
29. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

30. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
31. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
32. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
33. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
34. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия) или iCycler iQ/iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, или другие, рекомендованные Изготовителем).
35. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
36. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
37. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: культуры микроорганизмов, моча (только при подозрении на туберкулез данной локализации), тканевой (нативный) материал, парафиновые блоки, смывы с объектов окружающей среды.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Культуры микроорганизмов, выросшие на адаптированных для роста микобактерий питательных средах:

- а) Плотные среды - переносят колонии в стеклянные пробирки аналогично работе со стандартом мутности, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе с помощью стеклянных шариков и специального вортекса.
- б) Жидкие среды - используют оригинальный флакон.

Мочу собирают в одноразовые градуированные

завинчивающиеся емкости с широким горлом. Объем собранной мочи должен быть не менее 20 мл.

Для проведения смывов с объектов окружающей среды возможно использовать два варианта – взятие смывов в стерильный физиологический раствор с последующим выделением ДНК или взятие смывов с использованием ТЕ-буфера и проведением непосредственно ПЦР без выделения ДНК. При выборе варианта необходимо руководствоваться чистотой поверхностей. **Вариант без выделения ДНК целесообразно использовать для контроля чистоты рабочих мест в лаборатории, в остальных случаях нужно использовать вариант с выделением ДНК!** При любом варианте заранее подготавливают одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл, в которые вносят по 300 мкл стерильного физиологического раствора или ТЕ-буфера. Смыв проводят с 5-10 см² площади поверхности зондами с тампонами, которые перед проведением смыва смачивают раствором из подготовленных для этих объектов пробирок. Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку объёмом 1,5 мл с 0,3 мл раствора, верхнюю часть зонда отламывают и удаляют. Недопустимо использование ножниц для отрезания рабочей части зонда.

Тканевой материал помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала (кроме мочи и парафиновых блоков):

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток,
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца,
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Мочу хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч, в дальнейшем – замораживать и хранить аналогично другим видам материала.

Парафиновые блоки хранить при комнатной температуре, не допуская ее повышения до уровня, при котором происходит их плавление.

Допускается двукратное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

При работе с культурами микроорганизмов необходимо подготовить суспензию в стерильном физиологическом растворе любым удобным способом: с помощью используемого в лаборатории отраслевого оптического стандарта мутности (в России – 5 МЕ или 10 МЕ, или McFarland, в других странах – McFarland и т.п.) или с помощью Денситометра, а затем развести ее до концентрации 10^5 – 10^6 м.т./мл и 100 мкл использовать для экстракции ДНК.

Мочу перемешать одноразовой пастеровской пипеткой, отобрать 10 мл, поместить в завинчивающуюся пробирку, промаркировать ее и центрифугировать 10 мин при 10 тыс. g (не используя режим охлаждения). В случае отсутствия в лаборатории высокоскоростной центрифуги применять центрифугирование в режиме 20 мин при 3 тыс. g. Затем аккуратно, с помощью вакуумного отсасывателя, удалить надосадочную жидкость до осадка, в случае если осадок не виден – оставить 100 мкл образца.

Тканевой нативный материал гомогенизируют вручную с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с использованием автоматического гомогенизатора. Затем готовят ~ 10% (v/v) суспензию гомогената в стерильном физиологическом растворе.

При инструментальной гомогенизации тканевой материал помещают в одноразовую чашку Петри, одноразовым скальпелем отделяют фрагмент с визуализируемыми патологическими изменениями объемом не более 10 мм^3 (10 мкл). В случае визуализации различных очагов целесообразно взять несколько образцов ткани. Затем перенести их в одноразовые завинчивающиеся пробирки объемом 2,0 мл, положить в них по 1-2 металлических шарика $D = 3 \text{ мм}$ и добавить 90 мкл стерильного физиологического раствора.

Парафиновые блоки вырезают фрагмент ткани одноразовым скальпелем, удаляют парафин с помощью ксилола, а затем освобождаются от ксилола серией отмывок с понижающейся концентрацией этанола (аналогично стандартной гистологической проводке). Для экстракции берут 100 мкл образца без фрагментов стромальной ткани.

Смывы с объектов окружающей среды – при использовании физиологического раствора в пробирки объемом 1,5 мл переносят по 0,1 мл образцов смывов и проводят экстракцию ДНК комплектом реagens «РИБО-преп» или «ДНК-сорб-В». В случае выбора варианта исследования с ТЕ-буфером без выделения ДНК, в ПЦР-реакцию берут 0,01 мл образца.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Экстракция ДНК из исследуемого материала

Внимание! При работе с тест-системами для обнаружения возбудителей туберкулеза «МТБ-КОМ» и для дифференциации возбудителей туберкулеза «МТБ-ДИФ» используют одну и ту же пробу экстрагированной ДНК.

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- а) «ДНК-сорб-В» – из культур микроорганизмов, мочи, смывов с объектов окружающей среды;
- б) «РИБО-преп» – из культур микроорганизмов, мочи, парафиновых блоков и тканевого нативного материала, смывов с объектов окружающей среды;
- в) «ДНК-сорб-С-М» – из тканевого нативного материала и парафиновых блоков.

А. Экстракция ДНК из культур микроорганизмов, мочи, смывов с объектов окружающей среды при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Лизирующий раствор и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.

Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87** и по

300 мкл лизирующего раствора.

В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести по **100 мкл пробы²**, используя наконечники с фильтром.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**. Если подготовка проб велась с использованием физиологического раствора, то приготовить еще один отрицательный контроль экстракции (ОК ФР), в пробирку с **лизирующим раствором** внести 100 мкл физиологического раствора.

Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С периодически перемешивая. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на центрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на центрифуге 5 мин при 12 тыс об/мин и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенеся 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 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин 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 универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на центрифуге в течение 30 с. 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 10 тыс об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник

² Для биологического материала требуется этап пробоподготовки, см. раздел «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК»

для каждой пробы.

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

Поместить пробирки в термостат при температуре 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 10-12 тыс об/мин в течение 1 мин на центрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, и в течение года при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Если пробы ДНК подвергались хранению или произошло взмучивание сорбента универсального, непосредственно перед постановкой ПЦР пробирки следует процентрифугировать при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на центрифуге.

Б. Экстракция ДНК из культур микроорганизмов, мочи, парафиновых блоков и тканевого нативного материала, смывов с объектов окружающей среды при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп»

Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть в термостате при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции).

Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87** и по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО** внести по **100 мкл пробы**³, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОК**. Если подготовка проб велась с использованием

³ Для биологического материала требуется этап пробоподготовки, см. раздел «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК»

физиологического раствора, то приготовить еще один отрицательный контроль экстракции (ОК ФР), состоящий из 100 мкл физиологического раствора.

Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на центрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на центрифуге 5 мин при максимальных оборотах и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.

Процентрифугировать пробирки на центрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.

Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на центрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на центрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.

Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на

вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин** в течение **1 мин** на центрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С, до года при температуре не выше минус 16 °С.

В. Экстракция ДНК из тканевого нативного материала и парафиновых блоков при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-С-М»

Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре **64 °С** до полного растворения кристаллов.

Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции).

Добавить по **400 мкл буфера для лизирующего реагента** и по **17 мкл лизирующего реагента**. Промаркировать пробирки.

Внести в приготовленные пробирки по **100 мкл пробы**З, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**. Если подготовка проб велась с использованием физиологического раствора, то приготовить еще один отрицательный контроль экстракции (ОК ФР): в пробирку с **лизирующим раствором** внести 100 мкл физиологического раствора.

Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать и осадить капли на вортексе. Инкубировать пробирки в термостате при температуре **64 °С** в течение **1 ч**, периодически встряхивая на вортексе (не менее **5 раз** каждые **10–12 мин**). Допускается инкубация в течение **12 ч** при температуре **60 °С**.

Осадить нерастворенные частицы образцов центрифугированием при **12-14 тыс об/мин** в течение 5 мин.

Надосадочную жидкость в объеме **200 - 350 мкл** очень аккуратно (избегая попадания взвешенных частиц и капель жира) отобрать одноразовыми наконечниками с фильтрами и

перенести в новые пробирки.

Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Плотнo закрыть крышки и перемешать на вортексе, оставить в штативе на **10 мин**, перемешивая через каждые **2 мин**.

Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при **5 тыс об/мин** в течение **1 мин**. 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 универсального.

Осадить сорбент универсальный центрифугированием при **5 тыс об/мин** на центрифуге в течение **1 мин**. 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 **1 мин** при **10-12 тыс об/мин** на центрифуге. Отобратить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

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

Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **64 °С** на **5-10 мин** для подсушивания сорбента универсального.

В пробирки добавить по **50 мкл буфера для элюции В**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить пробирки в термостат при температуре **64 °С** на **5–10 мин**, периодически (1 раз в мин) встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при **12-14 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микрoцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С

в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Амплификация и детекция продуктов амплификации

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F и приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F и приборов iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 2.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F и приборов CFX-96, CFX-96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в Приложении 3.

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.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-1-FL *MTC-diff*, ПЦР-смеси-2-FRT, полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-1-FL *MTC-diff*, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *MTC-diff* хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные 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 установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «МТБ-ДИФ» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru⁴.

⁴ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ 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. Подготовка проб для амплификации

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

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *MTC-diff*, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FL *MTC-diff*, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FL *MTC-diff*
- 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

В подготовленные пробирки, используя наконечник с фильтром, добавить по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь.**

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) - внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК МТС-diff / STI**.

ВНИМАНИЕ! Для проведения деконтаминации реакционной смеси необходимо инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-анализа пробирки **10-30 мин** при комнатной температуре.

Б. Проведение ПЦР 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*).

Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных тест-систем, то в первую лунку должна попасть пробирка с наибольшим количеством флуорофоров. Например, при одновременной загрузке в ротор пробирок с тестами на обнаружение *Mycobacterium tuberculosis complex* («**МТБ-КОМ**») и его дифференциацию («**МТБ-ДИФ**»), в первую лунку следует поместить пробирки с реагентами для дифференциации *Mycobacterium tuberculosis complex* («**МТБ-ДИФ**»).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** 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 volum/Объем реакции** - 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть

отмечено окошко **15 ml oil layer volume/15 µL** объем масла/воска.

- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 2

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	15 с	–	5
	65	30 с		
	72	15 с		
Cycling 2/ Циклирование 2	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

- Нажать 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. Демек-ных**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции**. Для каналов 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 исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

В. Анализ результатов

Анализ результатов амплификации ДНК *M. tuberculosis* (канал FAM/Green):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать соответствующую кнопку **Cycling A. FAM/ Cycling A. Green** или **Cycling A. JOE/ Cycling A. Yellow** или **Cycling A. ROX/ Cycling A. Orange**, **Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна (**Quantitation analysis/ Количественный анализ**) должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект. Уклона**.
- 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 **More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.03**.
В таблице результатов (окно **Quant. Results/ Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК *M. bovis* и *M. bovis* BCG (канал JOE/Yellow), ДНК *M. bovis* BCG (канал ROX/Orange) и ДНК ВКО (канал Cy5/Red) провести аналогично анализу результатов по каналу **FAM/Green** в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 3

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../ Опт.уровня сигн.	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FL до 10FL	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	от 5FL до 10FL	0,05	включена	включена	10%
ROX/Orange	от 5FL до 10FL	0,05	включена	включена	10%
Cy5/Red	от 5FL до 10FL	0,05	включена	включена	30%

Г. 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 отсутствие) значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК *M. tuberculosis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение C_t , не превышающее 35.

В образце **обнаружена** ДНК *M. bovis* и/или *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение C_t , не превышающее 35.

В образце **обнаружена** ДНК *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналу ROX/Orange определено значение C_t , не превышающее 35, при этом значение C_t по каналу JOE/Yellow может быть определено или отсутствовать.

В образце **не обнаружена** ДНК *M. tuberculosis*, ДНК *M. bovis* и ДНК *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналам FAM/Green и JOE/Yellow, ROX/Orange не определено (отсутствует) значение C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу Cy5/Red определено значение C_t , не превышающее 35.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение *Ct* превышает 35 по каналам FAM/Green, JOE/Yellow или ROX/Orange, а по каналу Cy5/Red значение *Ct* не превышает 35. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена специфическая ДНК.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red значение порогового цикла *Ct* не определено (отсутствует), или превышает 35.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу			
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	≤ 35
OK ФР	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	≤ 35
K–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 32

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 4, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K–) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и/или для отрицательного (-ых) контроля (-ей) экстракции (OK, OK ФР), по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange 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 (целесообразно поставить не менее трех отрицательных контролей на этапе экстракции ДНК и столько же на этапе постановки ПЦР для выявления источника контаминации. Если результат повторяется, необходимо сменить реактивы) и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *MTC-diff*, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FL *MTC-diff*, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FL *MTC-diff*
- 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (K-) - внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (K+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *MTC-diff* / STI.

ВНИМАНИЕ! Для проведения деконтаминации реакционной смеси необходимо инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-анализа пробирки 10-30 мин при комнатной температуре.

Б. 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** 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, ROX, Cy5**. 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** в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop** 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, ROX, CY5**. 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). Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.
Задать программу амплификации (см. табл. 5).

Таблица 5

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	65	30 с		
	72	15 с		
3	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** 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** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (МТБ-ДИФ.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 «**95-65-72 МТС**» 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 Experimental 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

В. Анализ результатов

Анализ результатов амплификации ДНК *M. tuberculosis* (канал FAM), ДНК *M. bovis* и *M. bovis* BCG (канал JOE), ДНК *M. bovis* BCG (канал ROX) и ДНК ВКО (канал Cy5):

- Выбрать в окне модуля данные по анализируемому каналу. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Задать уровень пороговой линии на уровне, соответствующем **15** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+, ОК в последнем цикле амплификации. (Уровень флуоресценции К+, ОК считают равным ближайшему большему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца ПКО, ОК, ОК ФР имел характерный сигмообразный вид. Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон. Чтобы выделить график образца ПКО (или другого желаемого образца) можно воспользоваться кнопкой **Display Wells**, либо установить курсор на графике этого образца и сделать двойной щелчок. Чтобы изменить уровень пороговой линии нужно либо перетащить его с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать меню **Baseline Threshold** (в ниспадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле **Threshold Position**. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.

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

В образце **обнаружена** ДНК *M. tuberculosis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение *Ct*, не превышающее 37.

В образце **обнаружена** ДНК *M. bovis* и/или *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE определено значение *Ct*, не превышающее 37.

В образце **обнаружена** ДНК *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналу ROX определено значение *Ct*, не превышающее 37, при этом значение *Ct* по каналу JOE может быть определено или отсутствовать.

В образце **не обнаружена** ДНК *M. tuberculosis*, ДНК *M. bovis* и ДНК *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналам FAM и JOE, ROX не определено (отсутствует) значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу Cy5 определено значение *Ct*, не превышающее 38.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение *Ct* превышает 37 по каналам FAM, JOE или ROX, а по каналу Cy5 значение *Ct* не превышает 38. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена специфическая ДНК.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам FAM, JOE или ROX значение порогового цикла *Ct* не определено (отсутствует) или превышает 37, а по каналу Cy5 значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 38.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 6).

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	≤ 38
OK ФР	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	≤ 38
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам FAM, JOE, ROX, Cy5 отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 6, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам FAM, JOE, ROX, Cy5 и/или для отрицательного (-ых) контроля (-ей) экстракции (ОК, ОК ФР), по каналам FAM, JOE, ROX 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 (целесообразно поставить не менее трех отрицательных контролей на этапе экстракции ДНК и столько же на этапе постановки ПЦР для выявления источника контаминации. Если результат повторяется, необходимо сменить реактивы) и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ CFX-96, CFX-96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториес, Инк.»), США)

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

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

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *MTC-diff*, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FL *MTC-diff*, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FL *MTC-diff*
- 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь.**

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К–) - внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *MTC-diff* / STI.

ВНИМАНИЕ! Для проведения деконтаминации реакционной смеси необходимо инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-анализа пробирки 10-30 мин при комнатной температуре.

Б. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

- Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
- В стартовом окне *Startup Wizard* необходимо выбрать позицию *Create a new Run/Experiment* (или в меню *File*

выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.

- В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл

Таблица 7

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис). Нажать **OK**.

1	95,0 C for 15:00
→ 2	95,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	65,0 C for 0:30
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 2 , 4 more times
→ 6	95,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7	65,0 C for 0:30
	+ Plate Read
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8	72,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
9	GOTO 6 , 39 more times
	END

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX, Cy5** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем

задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

- Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

В. Анализ результатов

Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения прибора.

- Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
- В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

Вариант 1.

Поочередно для каждого канала установить пороговую линию (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на уровне, соответствующем **15 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца **K+**, **OK ФР** в последнем цикле амплификации. При этом кривая

флуоресценции для **K+** должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Вариант 2.

Поочередно для каждого канала отметить галочкой **Log Scale**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер.

– Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate**, задать в появившемся окне название образцов.

Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

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

В образце **обнаружена** ДНК *M. tuberculosis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение *Ct*, не превышающее 37.

В образце **обнаружена** ДНК *M. bovis* и/или *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналу HEX определено значение *Ct*, не превышающее 37.

В образце **обнаружена** ДНК *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналу ROX определено значение *Ct*, не превышающее 37, при этом значение *Ct* по каналу HEX может быть определено или отсутствовать.

В образце **не обнаружена** ДНК *M. tuberculosis*, ДНК *M. bovis* и ДНК *M. bovis* BCG, если для данной пробы в таблице результатов по каналам FAM и HEX, ROX не определено (отсутствует) значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу Cy5 определено значение *Ct*, не превышающее 38.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение *Ct* превышает 37 по каналам FAM, HEX или ROX, а по каналу Cy5 значение *Ct* не превышает 38. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена специфическая ДНК.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам FAM, HEX и ROX значение порогового цикла (*Ct*) не определено (отсутствует) или превышает 37, а по каналу Cy5 значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 38.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 8).

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу			
		FAM	HEX	ROX	Cy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	≤ 38
OK ФР	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	≤ 38
K–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5 отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 8, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K–) по каналам FAM, HEX и ROX и/или для отрицательного (-ых) контроля (-ей) экстракции (OK, OK ФР), по каналу FAM, HEX и ROX 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 (целесообразно поставить не менее трех отрицательных контролей на этапе экстракции ДНК и столько же на этапе постановки ПЦР для выявления источника контаминации. Если результат повторяется, необходимо сменить реактивы) и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

LOT

Код партии



Использовать до

VER

Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель