

«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-КОМ»
для выявления возбудителей туберкулеза *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции**

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «МТБ-КОМ» предназначена для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex (одного из видов *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* и др.) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для формы комплектации с электрофоретической детекцией, метод выявления основан на амплификации специфического участка ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента TaqF-полимеразы.

Для формы комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», метод выявления основан на амплификации специфического участка ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и зондов, меченных флуоресцентными красителями, и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента TaqF-полимеразы.

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, <i>Russia</i>)
Физиологический раствор	«РИБО-преп» «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5 «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 ²	1x10 ³
Моча			1x10 ³	1x10 ³
10% гомогенат разных видов нативной ткани (легкие, лимфатические узлы, почки, печень, мозг, селезенка)	«ДНК-сорб-С-М»		1x10 ²	5x10 ²
	«ДНК-сорб-С-М» «РИБО-преп»		1x10 ²	5x10 ²

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность тест-системы 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 67 референтных штаммов или культур. Из них 16 входили в состав группы *M.tuberculosis* complex, 23 являлись нетуберкулезными микобактериями, 28 принадлежали к другим родам и семействам. Специфичность набора реагентов оценивалась по отсутствию положительного результата амплификации ДНК бактерий, не принадлежащих к *M. tuberculosis* complex, а также по наличию положительного результата у бактерий, входящих в состав этой группы.

Перечень референтных штаммов и клинических изолятов:

Форма 1: **REF** VET-7-R0,5-K; **REF** V-3191-4-5; Форма 2: **REF** VET-50-FRT(RG,iQ)-K; **REF** V-3192-1 /

- Микобактерии, принадлежащие к группе *Mycobacterium tuberculosis* complex: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG и др.
- Нетуберкулезные микобактерии: *M.avium*, *M.fortuitum*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.marinum*, *M.paratuberculosis*, *M.phlei*, *M.scrofulaceum*, *M.smegmatis*, *M.xenopi*, *M.ulcerans*, *M.terrae* и др.
- Бактерии, принадлежащие к другим родам и семействам: *Brucella abortus*, *B.melitensis*, *B.ovis*, *B.suis*; *Campylobacter jejuni*; *Chlamydia suis*; *Chlamydophila abortus*, *Ch.felis*; *Cryptococcus neoformans*; *Enterobacter cloacae*, *E.faecalis*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Moraxella catarrhalis*; *Neisseria cinerea*, *N.elongata*, *N.flava*, *N.gonorrhoea*, *N.mucosa*, *N.sicca*, *N.subflava*, *N.pantoea agglomerans*; *Pasteurella tularensis*; *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*, *S.typhi*; *Shigella flexneri*, *Sh.sonnei*; *Staphylococcus aureus*, клинические изоляты *S.aureus* MRSA, *S.faecalis*, *S.saprophyticus*; *Streptococcus* A, B, C, G, *S.oralis*, *S.pneumoniae*.

Результаты тестирования показали 100 % специфичность.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, электрофоретической детекции, рекомендованные Изготовителем.

Форма 2 предназначена для проведения амплификации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Формы 1, 2 рассчитаны на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5 – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-R <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex, раскапана под воск	0,005	55 пробирок объемом 0,5 мл
2,5x ПЦР-буфер blue	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	0,2	1 пробирка
ТЕ-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 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	1,0	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	0,2	1 пробирка

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT MTC	0,28	2 пробирки
ПЦР-буфер-Flu	0,28	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК MTC / STI	0,1	1 пробирка
ТЕ-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	2 пробирки
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(-ах) 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.

ВНИМАНИЕ! Запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку,

Форма 1: **REF** VET-7-R0,5-K; **REF** V-3191-4-5; Форма 2: **REF** VET-50-FRT(RG,IQ)-K; **REF** V-3192-1 /

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 сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- 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.

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

- 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. Стекланные 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, Архmed, 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, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
- 18.Штативы для пробирок объемом 1,5 мл, 2,0 мл (например, Ахуген, 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. Комплекты 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

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) – при использовании прибора роторного типа.
29. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
30. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемым комплектом реагентов) (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 для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология»,

Россия) или другие, рекомендованные Изготовителем - при работе с формой комплектации с электрофоретической детекцией.

35. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия) или CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, и другие, рекомендованные Изготовителем) – при работе с формой комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
36. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
37. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
38. Емкость для сброса наконечников.

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

39. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ».
40. Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции продуктов амплификации – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: культуры микроорганизмов, моча (только при подозрении на туберкулез данной локализации), тканевой (нативный) материал, парафиновые блоки (только при проведении исследования с использованием Формы 2), 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

Форма 1: **REF** VET-7-R0,5-K; **REF** V-3191-4-5; Форма 2: **REF** VET-50-FRT(RG,iQ)-K; **REF** V-3192-1 /

аналогично работе со стандартом мутности, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе или 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

Форма 1: **REF** VET-7-R0,5-K; **REF** V-3191-4-5; Форма 2: **REF** VET-50-FRT(RG,iQ)-K; **REF** V-3192-1 /

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 – при использовании формы комплектации с электрофоретической детекцией:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК,
- электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле,
- анализ и интерпретация результатов.

при использовании формы комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридационно-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 и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.

Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО** (ВКО *Mycobacterium tuberculosis* complex или ВКО STI-87, в соответствии с используемой формой) и по **300 мкл лизирующего раствора**.

В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести по **100 мкл пробы**², используя наконечники с фильтром.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОК**. Если подготовка проб велась с использованием физиологического раствора, то приготовить еще один отрицательный контроль экстракции (ОК ФР), состоящий из 100 мкл физиологического раствора. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 90 мкл ОК и 10 мкл **ПКО ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra** (только при использовании Формы 1).

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**.

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

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 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** (ВКО *Mycobacterium tuberculosis* complex или ВКО STI-87, в соответствии с используемой формой) и по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО** внести по **100 мкл пробы³**, 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), состоящий из 100 мкл физиологического раствора. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 90 мкл ОКО и 10 мкл **ПКО ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra** (только при использовании Формы 1).

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, перенеся 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.

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

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 микроцентрифуге.

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 микроцентрифуге. 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.

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

Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО** (ВКО *Mycobacterium tuberculosis* complex или ВКО STI-87, в соответствии с используемой формой).

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

Внести в приготовленные пробирки по **100 мкл пробы**⁴, 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), состоящий из 100 мкл физиологического раствора. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 90 мкл ОКО и 10 мкл **ПКО ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra** (только при использовании Формы 1).

Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать и осадить капли на вортексе. Инкубировать пробирки 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 отдельными наконечниками с фильтром и перенести в новые пробирки.

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

⁴ Для биологического материала требуется этап пробоподготовки, см. раздел «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

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. Отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить процедуру отмывки **раствором для отмывки 2**, отобрать 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 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 центрифуге. 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.

Аmplификация и детекция продуктов амплификации

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант 50 R-0,5 и электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200 смотрите в Приложении 1.

Форма 1: **REF** VET-7-R0,5-K; **REF** V-3191-4-5; Форма 2: **REF** VET-50-FRT(RG,iQ)-K; **REF** V-3192-1 /

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 2.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F и приборов iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 3.

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 4.

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 50 R-0,5 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме полимеразы (TaqF). Полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-1-FRT *MTC* и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-1-FRT *MTC* и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *MTC* 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-КОМ» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru⁵.

⁵ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Амплификация

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

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-R *Mycobacterium tuberculosis complex* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке 2,5х ПЦР-буфер blue и полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл 2,5х ПЦР-буфера blue
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 10 мкл в пробирки для ПЦР

Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло можно не добавлять.

В подготовленные для ПЦР пробирки под масло, или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл разбавленного в 10 раз ПКО ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (к 10 мкл ПКО ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra наконечником с фильтром добавить 90 мкл ТЕ-буфера.

Б. Проведение амплификации

Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 2). Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 95 °С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки

амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 2

Программа для амплификации ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*

цикл	Для амплификаторов с матричным регулированием температуры			Для амплификаторов с активным регулированием температуры (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»))		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95°C	пауза		95°C	пауза	
1	95°C	15 мин	1	95°C	15 мин	1
2	95°C	30 с	42	95°C	20 с	42
	70°C	40 с		70°C	20 с	
				72°C	20 с	
3	72°C	2 мин	1	72°C	2 мин	
4	10°C	хранение		10°C	хранение	

После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР (зону 3).

Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 16 °С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле (проводится в зоне 3 при помощи комплекта «ЭФ»)

Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельном помещении сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

А. Приготовление рабочих растворов и агарозного геля

Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести

дистиллированной водой до **500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия – соединение, обладающее репродуктивной и острой токсичностью, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Агарозу для электрофореза ДНК из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы (время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин). Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до 65-70 °С.

Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **3 см** друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре) осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза так, чтобы лунки располагались ближе к отрицательному электроду. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Б. Порядок работы

Пробирки с продуктами амплификации последовательно выставить в штатив, отобрать из-под слоя масла по **10-15 мкл** проб и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо

промыть буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В **каждом** ряду дорожек геля должен обязательно присутствовать **K+** и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.

Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон», Россия) и источника питания «Эльф-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

По завершении электрофореза (краситель при этом пройдет примерно половину длины геля (не менее 1,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

Внимание! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

Анализ и интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

***Mycobacterium tuberculosis complex* - 390 п.н.**

ВКО *Mycobacterium tuberculosis complex* - 750 п.н.

В образце **обнаружена** ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, если в соответствующей ему дорожке присутствует полоса на уровне 390 п.н. большей или меньшей интенсивности.

В образце **не обнаружена** ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, если в соответствующей ему дорожке отсутствует полоса на уровне 390 п.н. и присутствует полоса на уровне 750 п.н.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы отсутствуют обе полосы, и 390 и 750 п.н. Необходимо провести повторную амплификацию невалидного образца, и в случае повторения невалидного результата, провести исследование, начиная с этапа экстракции ДНК.

Кроме полос **390 п.н.** и **750 п.н.** в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции ДНК (см. табл. 3).

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		390 п.н.	750 п.н.
ОК	Экстракция ДНК	Нет	Есть
ОК ФР	Экстракция ДНК	Нет	Есть
ПК	Экстракция ДНК	Есть	Есть
К–	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Нет

Возможные ошибки:

1. В дорожках, соответствующих положительным контролям (К+, ПК) отсутствуют специфические полосы на уровне 390 и 750 п.н. соответственно. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. В дорожках, соответствующих отрицательным контролям (ОК, ОК ФР, К–) присутствует специфическая полоса на уровне 390 или 750 п.н. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или кросс-контаминация реагентов и 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.

3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

Примечание:

При работе с материалом, содержащим большое количество клеток (например, ткани), в ПЦР участвует большое количество геномной ДНК. При этом в дорожках геля появляются характерные «шмеры», равномерно располагающиеся от лунки до самого низа дорожки или концентрирующиеся около лунки. На фоне такого «шмера» в положительном образце видна специфическая полоса, а в отрицательном образце полоса отсутствует. Однако большое количество геномной ДНК может ингибировать ПЦР (в дорожке отсутствует специфическая полоса 390 п.н.), в этом случае рекомендуется переставить амплификацию данной ДНК-пробы, разведя ее в 5 раз ТЕ-буфером для элюции ДНК.

При несоблюдении температурного режима могут появляться слабые полосы на разных уровнях, отличных от 390 п.н. Если интерпретация результатов затруднена, рекомендуется повторить амплификацию с теми же ДНК-пробами.

Следует повторить амплификацию также в случае очень низкой интенсивности специфической полосы (гораздо ниже интенсивности положительных контролей). Если такой результат повторяется, то его считают сомнительным. Для уточнения результата необходимо повторное исследование.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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 проведения ПЦР

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

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT *МТС*, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FRT *МТС*, ПЦР-буфер-Flu, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *МТС***
- **5 мкл ПЦР-буфера-Flu**
- **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, внести 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 ТЕ-буфера.**

б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *MTC / 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 No Domed 0.2 ml Tubes /Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** - 25 мкл. Для прибора Rotor-

Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/воска.**

- Нажать кнопку **Next/Далее.**
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля.**

Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 4

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °C	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	–	

* измерение флуоресценции по этим каналам не проводится при работе на двухканальных приборах, или если не предполагается одновременная загрузка в прибор теста для дифференцирования *Mycobacterium tuberculosis complex* до вида.

- Нажать дважды кнопку **OK/Да.**
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-мых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции.** Для обоих красителей 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* complex (канал FAM/Green):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green**, нажать кнопку **Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должны быть активированы кнопки **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 окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** 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 специфического участка ДНК ВКО STI-87 (канал JOE/Yellow):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow**, нажать кнопку **Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation**

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

- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** не должна быть активирована кнопка **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 окна **More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 15%**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.

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

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 *Mycobacterium tuberculosis* complex, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение **Ct**, не превышающее 35.

В образце **не обнаружена** ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green не определено (отсутствует) значение **Ct** (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение **Ct**, не превышающее 33.

Результат анализа **сомнительный**, если значение **Ct** превышает 35 по каналу FAM/Green. В этом случае рекомендуется повторная амплификация и детекция. В случае

если снова получен аналогичный результат, требуется провести анализ данного образца в двух повторах, начиная с этапа экстракции ДНК. При получении значения $Ct \leq 35$ по каналу FAM/Green хотя бы в одной из пробирок результат считается положительным, в иных случаях результат считается сомнительным.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу JOE/Yellow значение Ct не определено (отсутствует) или превышает 35, и по каналу FAM/Green значение Ct также не определено (отсутствует) или превышает 35. Необходимо провести повторную амплификацию. В случае получения аналогичного результата при повторной амплификации образца, необходимо провести анализ, начиная с этапа экстракции. При проведении полного цикла повторных исследований образец, для которого не удалось получить значимый результат исследования, обозначается как невалидный, при этом рекомендуется повторное взятие материала для исследования.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 5).

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	≤ 35
OK ФР	Экстракция ДНК	отсутствует	≤ 35
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 35	≤ 33

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по каналу FAM/Green отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 5, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.

2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и/или для отрицательного (-ых) контроля (-ей) экстракции (ОК, ОК ФР), по каналу FAM/Green 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 iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

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

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT *МТС*, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения *N* реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FRT *МТС*, ПЦР-буфер-Flu, полимеразу (TaqF), из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *МТС*
- 5 мкл ПЦР-буфера-Flu
- 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 ТЕ-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *МТС / 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 блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

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

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

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °С	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	–	

* измерение флуоресценции по этим каналам не проводится, если не предполагается одновременная загрузка в прибор теста для дифференцирования *Mycobacterium tuberculosis* complex до вида.

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке *Users*).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне *Protocol Filename* (MTC.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

- Выбрать в окне модуля данные по каналу FAM, отключив кнопку JOE. 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 **K+** в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции **K+** считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца **K+** 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 установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.

- Выбрать в окне модуля данные по каналу JOE. 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 K+ в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца ОК имел характерный сигмообразный вид. Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон. Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. 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 *Mycobacterium tuberculosis* complex, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение *Ct*, не превышающее 36.

В образце **не обнаружена** ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM не определено (отсутствует) значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу JOE определено значение *Ct*, не превышающее 36.

Результат анализа **сомнительный**, если значение *Ct* превышает 36 по каналу FAM, а по каналу JOE значение *Ct* не превышает 36. В этом случае рекомендуется повторная амплификация и детекция. В случае если снова получен аналогичный результат, требуется провести анализ данного образца в двух повторях, начиная с этапа экстракции ДНК. При получении значения $Ct \leq 36$ по каналу FAM хотя бы в одной из пробирок результат считается положительным, в иных случаях результат считается сомнительным.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам FAM, JOE значение *Ct* не определено (отсутствует)

Форма 1: **REF** VET-7-R0,5-K; **REF** V-3191-4-5; Форма 2: **REF** VET-50-FRT(RG,iQ)-K; **REF** V-3192-1 /

или превышает 36. Необходимо провести повторную амплификацию. В случае получения аналогичного результата при повторной амплификации образца, необходимо провести анализ, начиная с этапа экстракции. При проведении полного цикла повторных исследований образец, для которого не удалось получить значимый результат исследования, обозначается как невалидный, при этом рекомендуется повторное взятие материала для исследования.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 7).

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (C_t) по каналу	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	≤ 36
ОК ФР	Экстракция ДНК	отсутствует	≤ 36
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	≤ 36	≤ 34

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналу FAM отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 7, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам FAM, JOE и/или для отрицательного (-ых) контроля (-ей) экстракции (ОК, ОК ФР), по каналу FAM определено значение порогового цикла (C_t). 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 4

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-FRT *МТС*, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FRT *МТС*, ПЦР-буфер-Flu, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *МТС*
- 5 мкл ПЦР-буфера-Flu
- 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, внести 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 ТЕ-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *МТС / 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

Форма 1: [REF] VET-7-R0,5-K; [REF] V-3191-4-5; Форма 2: [REF] VET-50-FRT(RG,IQ)-K; [REF] V-3192-1 /

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 8

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °C	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	–	

* измерение флуоресценции по этим каналам не проводится, если не предполагается одновременная загрузка в прибор теста для дифференцирования *Mycobacterium tuberculosis* complex до вида.

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

- 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.

Форма 1: **REF** VET-7-R0,5-K; **REF** V-3191-4-5; Форма 2: **REF** VET-50-FRT(RG,IQ)-K; **REF** V-3192-1 /

Поочередно для каждого канала установить пороговую линию (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца **K+** 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 *Mycobacterium tuberculosis* complex, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение *Ct*, не превышающее 36.

В образце **не обнаружена** ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM не определено (отсутствует) значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу HEX определено значение *Ct*, не превышающее 36.

Результат анализа **сомнительный**, если значение *Ct* превышает 36 по каналу FAM, а по каналу HEX значение *Ct* не превышает 36. В этом случае рекомендуется повторная

амплификация и детекция. В случае если снова получен аналогичный результат, требуется провести анализ данного образца в двух повторах, начиная с этапа экстракции ДНК. При получении значения $Ct \leq 35$ по каналу FAM хотя бы в одной из пробирок результат считается положительным, в иных случаях результат считается сомнительным.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам FAM, HEX значение Ct не определено (отсутствует) или превышает 36. Необходимо провести повторную амплификацию. В случае получения аналогичного результата при повторной амплификации образца, необходимо провести анализ, начиная с этапа экстракции. При проведении полного цикла повторных исследований образец, для которого не удалось получить значимый результат исследования, обозначается как невалидный, при этом рекомендуется повторное взятие материала для исследования.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 9).

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу	
		FAM	HEX
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	≤ 36
OK ФР	Экстракция ДНК, ПЦР	отсутствует	≤ 36
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 36	≤ 34

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по каналу FAM отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 9, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам FAM, HEX и/или для отрицательного (-ых) контроля (-ей) экстракции (OK, OK ФР), по каналу FAM 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