

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для дифференцирования микобактерий туберкулеза
(*M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.bovis* BCG) в клиническом
материале и культурах микроорганизмов методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® MTC-diff-FL»

Формат FRT

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА SmartCycler (Cepheid, США).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).....	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	21

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов «АмплиСенс® МТС-diff-FL» для дифференцирования видов микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС) – человеческого (*M.tuberculosis*), бычьего (*M.bovis*), а также вакцинного штамма (*M.bovis* BCG) – в клиническом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) совместно с приборами для ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «в реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк., США));
- iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- SmartCycler II (Cepheid, США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red

¹ В каждом разделе методических рекомендаций названия каналов детекции даны в соответствии с описываемым прибором.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ 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 6.1 или выше, 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.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки или стрипы 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.

Поместить пробирки в ячейки ротора прибора Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установить ротор в прибор, закрыть крышку (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*). Если в один ротор загружаются пробирки с образцами, анализируемыми с помощью разных наборов реагентов, 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*, его количественное определение или дифференцирование, в первую лунку следует поместить пробирки с реагентами для количественного определения или дифференцирования *Mycobacterium tuberculosis complex*.

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
2. Во вкладке выбрать шаблон **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл** для редактирования и нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор**, и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes/Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	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	–	

6. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне:
 - а) для оптимизации измерения сигнала по выбранным каналам установить калибровку от **5FI** до **10FI** для всех каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red.

Для этого нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-МЫХ**, в открывшемся для первого канала окне (**Auto Gain Optimisation Channel**

Settings/Auto Gain Calibration Channel Settings/Установки Автооптимизации уровня сигнала) указать в строке **Target Sample Range/Нужный диапазон стартового сигнала** значения минимального и максимального сигнала, нажать кнопку **OK**. Автоматически откроется окно для следующего канала. Проверить выбранные для всех каналов значения можно в графах **Min Reading/Миним. Сигнал, Max Reading/Максим. Сигнал**.

8. Нажать кнопку **Next/Далее**. Для сохранения запрограммированного шаблона, необходимо, нажав кнопку **Save Template/Сохр.шаблон**, задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации.

Использование готового шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**, затем в списке шаблонов выбрать шаблон, запрограммированный согласно описанию в разделе **Создание шаблона**.
2. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes/Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**
3. В открывшемся окне, проверить, что указан объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, равный **25** мкл, и напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска** установлена галочка, активирующая эту опцию. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий автооптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. При этом ротор с образцами должен быть уже закреплен и крышка прибора закрыта. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
5. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «K-», положительный – «K+». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive**

control/Положительный контроль. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**. Нажать кнопку **Finish/OK/Закончить**.

ВНИМАНИЕ! При установке типа **None/Пусто** данные для образца анализироваться не будут!

Примечание – Для редактирования таблицы образцов до старта нужно, чтобы предварительно в меню **File/Файл** подменю **User preferences/Предпочтения** был выбран пункт **Edit Samples Before Run Started/Редактировать образцы перед стартом теста**.

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene. 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.

Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green:

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект. Уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
6. Выбрать параметр **More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб равным (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10%**.
7. В таблице результатов (окно **Quantitation Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Канал	<i>Threshold/Порог</i>	<i>Dynamic tube/Динамич.фон</i>	<i>Slope Correct/Коррект.уклона</i>	<i>More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов</i>
FAM/Green	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,05	включена	включена	10%
ROX/Orange	0,05	включена	включена	10%
Cy5/Red	0,05	включена	включена	30%

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее 15 мин.


2. Запустить программу iCycler iQ5.

3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

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.

Создание шаблона для проведения теста.

1. Задать схему планшета (расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала в исследуемых образцах):

- в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**,
- в открывшемся окне нажать кнопку **Whole Plate loading** и задать схему планшета, используя кнопки верхней панели. Указать имя проб в столбце **Identifier/Condition** в появившейся строке в нижней части экрана. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5. Нажать кнопку **Select/Add Fluorophores** и в открывшемся окне выбрать флуорофор, отметив его в графе **Selected** галочкой. Нажать **OK**. В окне **Fluorophore** появится название канала. Чтобы добавить измерение флуоресцентного сигнала к каждой пробе, необходимо нажать на флуорофор, чтобы он был активен, и, используя кнопку **Fluorophore loading in whole Plate mode**  над схемой, выделить пробы на планшете;

- 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**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.
2. Все биологические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-».
 3. Задать программу амплификации. Для этого в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество 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/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

4. 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 **Use Persistent Well Factors** (предлагается по умолчанию). Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
5. После окончания программы необходимо закрыть программу и выключить прибор (амплификатор и блок оптической системы).

Использование готового шаблонного файла для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в модуле в **Workshop** выбрать в верхнем левом окне необходимый файл постановки;
- в блоке **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и отредактировать схему планшета (по умолчанию файлы протоколов сохраняются

в папке **SampleFiles**);

- в блоке **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и проверить правильность выбранного протокола (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора iCycler iQ5. 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.

1. Запустить программу, выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**;
2. 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).
3. Задать уровень пороговой линии на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ПКО ДНК *MTC-diff / STI* в последнем цикле амплификации для всех каналов. Уровень флуоресценции образца считают равным ближайшему к нему большему делению шкалы, помеченному цифрой. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца ПКО ДНК *MTC-diff / STI* имел характерный сигмообразный вид. Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон.

Чтобы выделить график образца можно воспользоваться кнопкой **Display Wells**, либо установить курсор на графике этого образца и сделать двойной щелчок.

4. 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**. Для выведения на экран таблицы результатов, нажать кнопку **Results**.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА SmartCycler (Cepheid, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок на 0,025 мл (CERPID, США).

1. Перед постановкой в амплификатор необходимо опустить реакционную смесь в нижнюю термоциклируемую часть пробирки. Для этого нужно поместить их в ротор специальной центрифуги Mini-Spin (фирмы Cepheid, США) и включить ее на 5-7 с.
2. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.

Программирование амплификатора

1. Открыть программу для прибора **SmartCycler**.
2. В основном меню программы выбрать **Define Protocols**. В открывшемся окне выбрать кнопку в нижнем левом углу экрана кнопку **New Protocol**, дать название протоколу **95-65-72 MTC** и запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации.

**Программа амплификации «95-65-72 MTC»
для прибора SmartCycler (Cepheid, США)**

<i>Температура, °C</i>	<i>Время</i>	<i>Количество циклов</i>
95	900 с	1
95	20 с	45
65	50 с	
72	20 с	

3. В нижней части окна нажать кнопку **Save Protocol**.
4. Нажать кнопку **Create Run** в основном меню программы. В левой центральной части экрана нажать кнопку **Dye set** и выбрать комбинацию красок **FCTC25**.
5. В центре экрана нажать кнопку **Add/Remove Sites** и в появившемся окне выбрать нужный протокол (программу) и сайты, в которых проводится анализ. Нажать кнопку **OK**.
6. Запустить выполнение программы эксперимента кнопкой в нижней части экрана **Start Run**. В появившемся диалоговом окне нужно ввести имя файла, в котором будут сохранены все данные эксперимента.
7. В таблице в верхней половине окна перечислены установки анализа данного эксперимента. В этой таблице для каждого образца в столбце **Sample Type** по

умолчанию указан тип образца **UNKN** (неизвестный). В колонке **Sample ID** дается название каждому образцу.

Обработка и анализ данных

1. Выбрать в меню **Analysis settings**. Задать уровень расчета пороговой линии равный 30 для каналов **FAM, Cy3, Texas Red, Cy5**.
2. В таблице результатов (окно **Results Table**) для каждой пробы появятся значения **Ct** по каналам **FAM, Cy3, Texas Red** и **Cy5**.

Результаты можно интерпретировать, пользуясь автоматической интерпретацией, отраженной в таблице результатов (**Results**) и визуально, просматривая графики кривых флуоресценции по каналам **FAM, Cy3, Texas Red** и **Cy5**.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации, в соответствии с табл.1.

Таблица 1

Результаты для контролей этапа амплификации на приборе SmartCycler

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат по каналу			
		FAM	Cy3	Texas Red	Cy5
К+	ПЦР	POS	POS	POS	POS
К-	ПЦР	NEG	NEG	NEG	NEG

Интерпретация результатов в клинических образцах и культурах микроорганизмов

Таблица 2

Интерпретация результатов исследуемых образцов на приборе SmartCycler

ДНК микобактерий вида	FAM	Cy3	Texas Red	Cy5	Результат	Форма ответа, вносимого в бланк результатов исследования
<i>M.tuberculosis</i>	POS	POS / NEG	POS / NEG	POS / NEG	Обнаружена	ДНК <i>M.tuberculosis</i> (человеческий вид) обнаружена
	NEG	POS / NEG	POS / NEG	POS	Не обнаружена	ДНК <i>M.tuberculosis</i> (человеческий вид) не обнаружена
	NEG	POS / NEG	POS / NEG	NEG	Невалидный	Обнаружение ДНК <i>M.tuberculosis</i> (человеческий вид) – результат невалидный.

						Рекомендуется повторное взятие материала
M.bovis	POS / NEG	POS	POS / NEG	POS / NEG	Обнаружена	ДНК <i>M.bovis</i> (бычий вид) обнаружена
	POS / NEG	NEG	POS / NEG	POS	Не обнаружена	ДНК <i>M.bovis</i> (бычий вид) не обнаружена
	POS / NEG	NEG	POS / NEG	NEG	Невалидный	Обнаружение ДНК <i>M.bovis</i> (бычий вид) – результат невалидный. Рекомендуется повторное взятие материала
M.bovis BCG	POS / NEG	POS / NEG	POS	POS / NEG	Обнаружена	ДНК <i>M.bovis</i> BCG (вакцинный штамм) обнаружена
	POS / NEG	POS / NEG	NEG	POS	Не обнаружена	ДНК <i>M.bovis</i> BCG (вакцинный штамм) не обнаружена
	POS / NEG	POS / NEG	NEG	NEG	Невалидный	Обнаружение ДНК <i>M.bovis</i> BCG (вакцинный штамм) – результат невалидный. Рекомендуется повторное взятие материала

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **ДНК *M.tuberculosis* обнаружена**, если для исследуемого образца в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM** в графе **Std/Res FAM** указан результат **POS** ($Ct_{FAM} \neq 0$). При этом кривая флуоресценции образца должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- **ДНК *M.bovis* обнаружена**, если для исследуемого образца в таблице результатов в графе **Std/Res Cy3** указан результат **POS** ($Ct_{Cy3} \neq 0$). При этом кривая флуоресценции образца должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- **ДНК *M.bovis* BCG обнаружена**, если для исследуемого образца в таблице результатов в графе **Std/Res Texas Red** указан результат **POS** ($Ct_{TexasRed} \neq 0$). При этом кривая флуоресценции исследуемого образца должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. В связи с тем, что вакцинный штамм ***M.bovis* BCG** относится к

- бычьему виду МБТ (*M.bovis*), в таблице результатов в графе **Std/Res Cy3**, так же может быть указан результат **POS** ($Ct_{Cy3} \neq 0$);
- ДНК *M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.bovis* BCG не обнаружена, если для исследуемого образца кривая флуоресценции по каналам **FAM**, **Cy3** и **Texas Red** не пересекает пороговую линию (в таблице результатов в соответствующих графах указаны результаты **NEG** ($Ct_{FAM}=0$, $Ct_{Cy3}=0$, $Ct_{TexasRed}=0$); при этом в графе **Std/Res Cy5** указан результат **POS** ($Ct_{Cy5} \neq 0$) или **NEG** ($Ct_{Cy5}=0$);
 - Валидность результатов по всем каналам интерпретируется независимо. Если в таблице результатов в графах **Std/Res FAM** и **Std/Res Cy5** или **Std/Res Cy3** и **Std/Res Cy5** или **Std/Res Texas Red** и **Std/Res Cy5** указаны результаты **NEG** ($Ct_{FAM}=0$, $Ct_{Cy3}=0$, $Ct_{TexasRed}=0$, $Ct_{Cy5}=0$, соответственно), требуется повторная амплификация этого образца; в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК. Если валидный результат не получен, то результат дифференциации соответствующего вида **МБТ** интерпретируется как **невалидный**, при этом рекомендуется повторное взятие материала.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.

Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста «**95-65-72 МТС**» – и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный
 - **Метод** – Пороговый (**Ct**)
 - **Пробирки** – отметить галочкой образец, контроль +, контроль –
 - **Контроли:** положительный (К+) – 1 , отрицательный (К-) – 1.
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл
 - **Флуорофоры Fat, Hex, Rox** – «Специфика», **Sy5** – «ВКО».
 - Задать программу амплификации Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество 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, Hex, Rox, Cy5	
	72	15 с	–	

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
 3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «95-65-72 МТС», указать количество образцов, нажать **ОК**.
 4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
 5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 30 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
 6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
- ВНИМАНИЕ!** Следить 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 переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.
7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Использование готового шаблонного файла для проведения теста


Для запуска прибора можно также использовать ранее созданный шаблон теста с заданными параметрами амплификации и заданным количеством контролей. Для этого:


- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «95-65-72 МТС», указать количество образцов, нажать **ОК**;
- присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку

напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**;
в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». 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.

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс)** для версии программы v.7.5. и выше).
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 100%**.
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10%** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
6. Для дальнейшей работы с данными можно скопировать результаты значений *Ct* для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета в виде файла Word нажать

кнопку **Отчет по результатам анализа** . Далее выбрать галочками параметры, необходимые для отображения в отчете, нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат ***.xls Excel** либо ***.rtf MS Word** и папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк») США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File/Experiment** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**).
2. 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.**

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество 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, 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. ниже). 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 на 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 в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
 - Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, задать 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**.

Использование готового шаблона для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;

в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

Анализ результатов

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96 / CFX96 Touch. 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.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. 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 10 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции для ПКО 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.

3. 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**.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.