

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 04.05.2012 № 2126-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«05» мая 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза
(*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом
материале, культурах микроорганизмов и объектах
окружающей среды методом полимеразной цепной реакции
(ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® МТС-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ..... | 4 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 6 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 8 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 9 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.. | 12 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК..... | 14 |
| ФОРМАТ FEP | 16 |
| СОСТАВ | 16 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ | 18 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ | 18 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ | 18 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 18 |
| Б. Проведение амплификации | 20 |
| ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» | 20 |
| ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 21 |
| ФОРМАТ FRT | 25 |
| СОСТАВ | 25 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ | 27 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ | 27 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»..... | 27 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 27 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» | 28 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 30 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 33 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»..... | 34 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» | 36 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-С»..... | 38 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 41 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|---|
| БАЛ | - бронхо-альвеолярный лаваж |
| ВКО | - внутренний контрольный образец |
| ВКО STI-87 | - внутренний контрольный образец STI (self-tested inclusion) длиной 87 нуклеотидов для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией |
| К- | - отрицательный контроль ПЦР |
| К+ | - положительный контроль ПЦР |
| МБТ (МТС) | - микобактерии туберкулеза (<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>) |
| м.т. | - микробные тела |
| ОКО | - отрицательный контрольный образец |
| ОК | - отрицательный контроль экстракции |
| ПВБ | - промывные воды бронхов |
| ПКО | - положительный контрольный образец |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FEF | - флуоресцентная детекция по «конечной точке» |
| FRT | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |
| PBS | - фосфатно-солевой буфер |
| UDG | - фермент UDG – фермент урацил-ДНК-гликозилаза |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» предназначен для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС), включающий в себя виды микобактерий разной степени вирулентности, вызывающих туберкулез у человека (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*, *M.pinipedii*), в разных видах клинического материала, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Обнаружение ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС) – методом

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: 1) экстракцию (выделение) тотальной ДНК из образцов клинического материала, парафиновых блоков, культур микроорганизмов или смывов с объектов окружающей среды, а также внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), внесенного в тестируемый образец в начале анализа; 2) одновременную амплификацию фрагмента ДНК *MTC*, т.е. микобактерий туберкулеза, и фрагмента ДНК ВКО; 3) гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (формат FRT), либо после ее завершения с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (формат FEP).

Гибридационно-флуоресцентная детекция специфической мишени проводится по каналу FAM/Green (или аналогичному, в зависимости от модели прибора), ВКО – по каналу JOE/Yellow/HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора).

«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT, входящие в состав данного набора реагентов, содержат фермент UDG для снижения риска контаминации продуктами амплификации в ПЦР-лабораториях.

С целью оптимизации протоколов исследования микобактерий туберкулеза возможно проведение единой процедуры экстракции ДНК для последующего обнаружения, количественного определения, дифференцирования до вида *M. tuberculosis complex* и определения резистентности к противотуберкулезным препаратам.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК и амплификацию ДНК *MTC* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения амплификации ДНК *MTC* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2, 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК и амплификацию ДНК *MTC* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения амплификации ДНК МТС с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид клинического материала | Комплект для экстракции ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствительность, м.т./мл |
|--|-----------------------------|--------------------------------------|---|
| | | | <i>M.tuberculosis</i> (штамм H37 Ra) |
| PBS-буфер, мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT | 5×10^2 |
| Моча | | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT | 1×10^3 |
| Смывы с объектов окружающей среды ² | | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT | $2,5 \times 10^2$ копий/мл |
| PBS-буфер, мокрота | «ДНК-сорб-В» | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT | 5×10^2 |
| Бронхоальвеолярный лаваж, моча | | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT | 1×10^3 |
| Смывы с объектов окружающей среды ² | | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT | $2,5 \times 10^2$ копий/мл |
| 10% гомогенат разных видов тканей (легкие, лимфатические узлы, почки, печень, мозг, селезенка) | «ДНК-сорб-С» | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT | 1×10^2 |

² Допускается проведение исследования без этапа экстракции ДНК при добавлении образца смывов с объектов окружающей среды непосредственно в реакционную смесь для проведения ПЦР-исследования.

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность оценивалась как при тестировании штаммов микобактерий входящих в группу *M.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 5×10^8 м.т./мл), тестировали 67 контрольных штаммов или клинических изолятов. 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:

- 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.gonor*, *N.mucosa*, *N.sicca*, *N.subflava*, *N.pantoea agglomerans*; *Pasteurella tularensis*; *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*, *S.typhi*; *Shigella flexneri*, *Sh.sonne*; *Staphylococcus aureus*, различные клинические изоляты *S.aureus* MRSA, *S.faecalis*, *S.saprophyticus*; *S.Streptococcus* A, B, C, G, *S.oralis*, *S.pneumonia*.

Результаты тестирования показали 100 % специфичность как для набора реагентов в варианте FRT, так и в варианте FEP.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе в лабораториях противотуберкулезных учреждений следует дополнительно руководствоваться требованиями Приказа № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (Приложение №11).

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Инфицированный материал, а также одноразовая пластиковая посуда, соприкасавшаяся с инфицированным материалом, должна сбрасываться на 120 мин в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2% раствор ДП-2Т, на 180 мин в 0,3 % раствор жавелиона или использовать другие хлорсодержащие дезинфицирующие средства.
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным.

Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с 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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из клинического материала

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 4 (формат FEP и формат FRT).
2. Ламинарный бокс (класс биологической безопасности тип II А для лабораторий ПЦР в составе клиничко-диагностических лабораторий или тип II В для лабораторий ПЦР в составе противотуберкулезных учреждений).

3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
5. Центрифуга/вортекс.
6. Гомогенизатор для тканевых образцов (например, гомогенизатор TissueLyser LT, Qiagen, Германия, центрифуга/вортекс «Мультиспин MSC-6000» с ротором RC-1.5, BioSan, Латвия) или фарфоровые ступки с пестиками.
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
8. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема.
9. Механический дозатор переменного объема 1-5 мл.
10. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл (для работы с центрифугой/вортексом «Мультиспин MSC-6000»).
12. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся конические свободно-стоящие пробирки с объемом 2,0 мл (например, № 72.694.100, Sarstedt, Германия) (для работы с гомогенизатором TissueLyser LT, Qiagen, Германия).
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 (200) мкл и до 1000 мкл.
14. Одноразовые наконечники для дозаторов до 5000 мкл.
15. Штативы для наконечников.
16. Стекланные или фарфоровые шарики, стерильные, для гомогенизации мокроты (D=3-5 мм) и тканевого материала (D=3 мм).
17. Металлические шарики, стерильные, для гомогенизации тканевого материала (D=5-7 мм).
18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
19. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. ПЦР-бокс.
2. Центрифуга/вортекс.

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 (200) мкл.
5. Штативы для наконечников и пробирок на 0,5 (0,2) мл.
6. 2 холодильника от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С, соответственно для хранения образцов ДНК и реагентов.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
9. Персональный компьютер для работы с амплификатором (формат FRT) или флуоресцентным ПЦР-детектором (формат FEP).

При работе с «ПЦР-комплектom» вариант FEP:

10. Программируемый амплификатор (например, МахуGene (Axugen Scientific, США), «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
11. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» и «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
12. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки указанного объема (например, GeneAmp PCR System 2700, МахуGene) или объемом 0,5 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки указанного объема (например, «Терцик»).

При работе с «ПЦР-комплектom» вариант FRT:

13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000, (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ или iQ5 (Bio-Rad, США), Мх3000Р, Мх3005 (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и SmartCycler II в комплекте со специальной центрифугой Mini-Spin (фирмы Serheid, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

14. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл для приборов формата ПЦР режиме «реальном времени» с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene для постановки в ротор на 36 пробирок) или с куполообразной крышкой на 0,2 мл для приборов формата ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через крышку (например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3005, «ДТ-96») или специальные реакционные модули для прибора SmartCycler II.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Взятие материала

- 1. Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ), ликвор** собирают в одноразовые плотно закручивающиеся емкости из полипропилена (во избежание адгезии клеток на внутренней поверхности емкости) объемом не менее 5 мл.
- 2. Мокроту, мочу (среднюю порцию)** собирают в одноразовые градуированные закручивающиеся емкости с широким горлом объемом не менее 50 мл.
- 3. Кровь, плевральную жидкость** собирают в пробирки типа Vacuette® с раствором или напылением ЭДТА. Закрытую пробирку с материалом несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант. Для анализа используют цельную кровь, собранную у пациента утром натощак.
- 4. Менструальную кровь** собирают с помощью колпачка Кафка, собранную кровь переносят в сухую одноразовую пробирку.
- 5. Синовиальную жидкость** собирают в сухую одноразовую пробирку.
- 6. Секрет предстательной железы** получают одним из двух способов:
 - а) После окончания массажа предстательной железы ее секрет** собирают в одноразовую стерильную пробирку объемом 1,5 мл;
 - б) При невозможности получить секрет – сразу после массажа собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы).**

7. **Тканевой** (биопсийный и операционный) материал помещают в пробирки типа Vacuette® с напылением раствора ЭДТА или в одноразовую пробирку, содержащую 0,2 мл стерильного физиологического раствора.
8. **Парафиновые блоки** нарезают на микротоме или вырезают фрагмент ткани одноразовым скальпелем, удаляют парафин с помощью ксилола, а затем освобождаются от ксилола серией отмывок с понижающейся концентрацией этанола (аналогично стандартной гистологической проводке).
9. **Культуры микроорганизмов**, выросшие на селективных для микобактерий туберкулеза питательных средах:
 - а) Плотной - переносят колонии в стеклянные пробирки аналогично работе со стандартом мутности, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе или PBS-буфере.
 - б) Жидкой - используют оригинальный флакон.
10. **Смывы с объектов окружающей среды** берут зондами с тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором. Площадь смыва с плоской поверхности составляет 5-10 см². Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку объёмом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, верхнюю часть зонда отламывают и удаляют.

Хранение материала (в случае отсроченного выполнения анализа, резервирования материала для возможной перестановки, а также хранения архивных образцов) возможно по следующей схеме: предполагаемое хранение в течение 3 сут (кроме мочи) – допускается температура от 2 до 8 °С; хранение не более 1 года - допускается температура не выше минус 16 °С; архивирование образцов на срок более 1 года – температура не должна превышать минус 68 °С. Мочу хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч, в дальнейшем – замораживать. Кровь не замораживают. Допускается двукратное замораживание-оттаивание остального клинического материала.

Транспортирование материала осуществляют в термоконтейнере с хладагентом не более 3 сут.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

1. **Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ)** или **промывные воды бронхов (ПВБ)** перемешать переворачиванием в исходной емкости. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отобрать 1 мл образца, поместить в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф», промаркировать ее и центрифугировать 10 мин при 10 тыс g. Затем аккуратно удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя 100 мкл образца.
2. В емкость с **мокротой** добавить «Муколизин» (реагент производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предобработки мокроты) в соотношении 1:5, ориентируясь по градуировке емкости и стерильные фарфоровые или стеклянные шарики в количестве 3-5 штук. В процессе разжижения мокроты (20-30 мин) емкость необходимо периодически встряхивать. Затем автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отобрать 100 мкл материала, поместить в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» и промаркировать ее.
3. **Мочу** перемешать переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отобрать 5-10 мл образца, поместить в завинчивающуюся пробирку, промаркировать ее и центрифугировать 10 мин при 10 тыс g. В случае отсутствия в лаборатории высокоскоростной центрифуги применять центрифугирование в режиме 3 тыс g x 20 мин. Затем аккуратно, с помощью вакуумного отсасывателя, удалить надосадочную жидкость до осадка, в случае если осадок не виден – оставить 100 мкл образца.
4. В **синовиальную жидкость** добавить объем «Муколизина» (реагент производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предобработки мокроты) в соотношении 1:1, в процессе разжижения материала (20-30 мин) пробирку необходимо периодически встряхивать.
5. Поместить **тканевой материал** в одноразовую чашку Петри, одноразовым скальпелем отделить фрагмент объемом не более 10 мм³ (10 мкл). При использовании центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» (12 гнезд) перенести фрагменты ткани в одноразовые

полипропиленовые заворачивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл, положить в них по 2-3 стерильных стеклянных шарика. При использовании гомогенизатора TissueLyser LT фрагменты ткани перенести в одноразовые заворачивающиеся пробирки объемом 2,0 мл, положить в них по 1-2 металлических шарика. В случае использования фарфоровых ступок с пестиками поместить в ступку образец ткани и добавить равный объем PBS-буфера или стерильного физиологического раствора и гомогенизировать образец.

6. **Колонии микроорганизмов**, выросших на **плотной** питательной среде (ППСр) ресуспендировать в стерильном физиологическом растворе (или PBS-буфере), используя стандарт мутности №5 (5×10^8 м.т./мл) или McFarland № 0,5, 1 или 2. Для исследования используют 5 мкл суспензии. При исследовании культуры, выросшей на **жидкой** питательной среде (ЖПСр) отобрать аликвоту объемом 1 мл и центрифугировать 10 мин при 1 тыс g, затем удалить надосадочную жидкость.
7. **Смывы с объектов окружающей среды** – для исследования используется 100 мкл раствора.

Таблица 1

Объем проб, используемый для пробоподготовки и экстракции ДНК

| Вид материала | Объем аликвоты для пробоподготовки | Объем аликвоты для экстракции ДНК |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Мокрота | весь образец | 0,1 мл |
| БАЛ или ПВБ | 1 мл | 0,1 мл |
| Моча | 5-10 мл | 0,1 мл |
| Ликвор | 1 мл | 0,1 мл |
| Синовиальная жидкость | 1 мл | 0,1 мл |
| Секрет простаты | 1 мл | 0,1 мл |
| ППСр | $1,5-6 \times 10^8$ м.т./мл | 0,05 мл |
| ЖПСр | 1 мл | 0,1 мл |
| Кровь | | 0,1 мл |
| Менструальная кровь | | 0,1 мл |
| Ткань | | 10-25 мкл |
| Смывы с объектов окружающей среды | | 0,1 мл |

Необходимо предусмотреть возможное повторное выделение пробы и резервировать аликвоту образца согласно правилам хранения материала.

ФОРМАТ FEP**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-------------------------|---|------------------|---------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| TE-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--------------------------|---|------------------|---------------|
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ³ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 25 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 10 | 1 флакон |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала, продуктов питания и кормов для животных – **включает:**

³ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса, буфера для лизирующего реагента и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FEP

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|--------------------------------|---|-----------|------------|
| Буфер для лизирующего реагента | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 20 | 1 флакон |
| Лизирующий реагент | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,85 | 1 пробирка |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| TE-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|---------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ПЦР-смесь-1-FEP MTC | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28 | 2 пробирки |
| ПЦР-буфер-Flu | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-Фон | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| Минеральное масло для ПЦР | Бесцветная вязкая жидкость | 2,0 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| Фермент UDG | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК MTC / STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| TE-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

ФОРМАТ FEP

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|------------------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,6 | 1 пробирка |
| ВКО STI-87 | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |
| РНК-буфер⁴ | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- **«ДНК-сорб-В»** для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды;
- **«РИБО-преп»** для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды;
- **«ДНК-сорб-С»** для экстракции ДНК из тканей человека.

Детальная информация по их использованию изложена в Приложениях 1, 2, 3 к данной инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

⁴ Пробирка с РНК-буфером используется для элюции при экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл для амплификации исследуемых, контрольных (один контроль экстракции, два контроля амплификации) и фоновых пробирок (2 пробирки «Фон»).
2. Приготовить образцы **«Фон»**. Для каждого из образцов смешать по 10 мкл **ПЦР-смеси-1-FEP MTC** и по 15 мкл **ПЦР-смеси-Фон**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
3. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь из расчета по 10 мкл **ПЦР-смеси-1-FEP MTC**, 5 мкл **ПЦР-буфера-Flu**, 0,5 мкл **полимеразы (TaqF)** и 0,5 мкл **Фермента UDG** на одну реакцию. Полученную реакционную смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. В подготовленные пробирки для амплификации исследуемых и контрольных проб внести по 15 мкл подготовленной реакционной смеси.
5. На поверхность реакционной смеси всех пробирок, включая контрольные и фоновые, добавить по капле минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. При добавлении проб ДНК при использовании «ДНК-сорб-В» и «ДНК-сорб-С» необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
7. 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**.

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

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

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации. **Программы амплификации «65 МТС»** для амплификаторов с активным и матричным регулированием указаны в табл. 2.
2. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить на амплификаторе выполнение программы термоциклирования.

Таблица 2

Программы амплификации «65 МТС»

| Для амплификаторов с активным регулированием ⁵ | | | | Для амплификаторов с матричным регулированием ⁶ | | | |
|---|-----------------|----------|--------|--|-----------------|----------|--------|
| Цикл | Температура, °С | Время | Циклов | Цикл | Температура, °С | Время | Циклов |
| 1 | 95 | 15 мин | 1 | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 | 15 с | 45 | 2 | 95 | 20 с | 45 |
| | 65 | 20 с | | | 65 | 20 с | |
| | 72 | 15 с | | | 72 | 20 с | |
| 3 | 10 | Хранение | | 3 | 10 | Хранение | |

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели

⁵ Например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США).

⁶ Например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), MaxyGene (Axygen Scientific, США), PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra, Германия).

прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации специфической мишени.

- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ВКО.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к «ПЦР-комплекту», а также методические рекомендации по применению набора реагентов для обнаружения микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] МТС-FL» формат FEP, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

1. Для канала FAM, измеряющего сигнал для специфической мишени, предусмотрена опция 2 пороговых значений – положительного и отрицательного результатов, для канала HEX – единственного порога.
2. Значения ниже порогового значения отрицательного результата принимаются отрицательными, выше порогового значения положительного результата – положительными, между порогами – сомнительными.
3. При получении сомнительного результата детекции требуется повторное проведение анализа данного образца – повторная амплификация, а в случае повторного получения сомнительного результата – повторная экстракция ДНК.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Конт-роль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Сигнал по каналу | | Обозначение результата в программах некоторых детекторов |
|-----------|--------------------------------------|---|---------------------------------|--|
| | | FAM | HEX | |
| OK | Экстракция ДНК, ПЦР | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Выше</u> порогового значения | «-» или «OK» |
| K- | ПЦР | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения | «нд» |
| K+ | ПЦР | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | <u>Выше</u> порогового значения | «+» или «OK» |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал FAM ниже порогового значения положительного результата или по каналу HEX ниже порогового значения, необходимо повторно провести анализ для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, а также для положительного контроля ПЦР (K+), начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу FAM выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, а также для этого/этих контролей, начиная с этапа экстракции ДНК.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Таблица 4

Интерпретация результатов исследуемых образцов

| FAM | HEX | Валидность результата | Форма выдачи ответа |
|--|---|-----------------------|--|
| <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | <u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения | валидный | <i>M.tuberculosis complex</i> обнаружена |
| <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Выше</u> порогового значения | валидный | <i>M.tuberculosis complex</i> не обнаружена |
| Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата | <u>Выше</u> порогового значения | невалидный | сомнительный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала |
| <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения | невалидный | невалидный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала |

В случае получения сигнала:

- Выше порогового значения положительного результата по каналу FAM и выше или ниже порогового значения по каналу HEX – результат валидный - в образце исследуемого материала *M. tuberculosis complex* **обнаружена**.
- Ниже порогового значения отрицательного результата по каналу FAM и выше порогового значения по каналу HEX – результат валидный - в образце исследуемого материала *M. tuberculosis complex* **не обнаружена**.
- Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата по каналу FAM и ниже порогового значения по каналу HEX – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как **сомнительный**, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.
- Ниже порогового значения отрицательного результата по

каналу FAM и ниже порогового значения по каналу HEX – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, и в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как **невалидный**, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-------------------------|---|------------------|---------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость ⁷ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ⁷ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| TE-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--------------------------|---|------------------|---------------|
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ⁷ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 25 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 10 | 1 флакон |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала, продуктов питания и кормов для животных – **включает:**

⁷ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса, буфера для лизирующего реагента и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--------------------------------|---|------------------|---------------|
| Буфер для лизирующего реагента | Прозрачная бесцветная жидкость ⁷ | 20 | 1 флакон |
| Лизирующий реагент | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,85 | 1 пробирка |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ⁷ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

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

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|---------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FRT MTC | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28 | 2 пробирки |
| ПЦР-буфер-Flu | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| Фермент UDG | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК MTC / STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,6 | 1 пробирка |
| ВКО STI-87 | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |

ФОРМАТ FRT

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| РНК-буфер ⁸ | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Используются наборы реагентов:

- «ДНК-сорб-В» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды,
- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды,
- «ДНК-сорб-С» для экстракции ДНК из тканей человека.

Детальная информация по их использованию изложена в приложениях 1, 2, 3 к данной инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок, стрипов или плашек для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

1. Отобрать необходимое количество пробирок для

⁸ Пробирка с РНК-буфером используется для элюции при экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп».

амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных (один контроль экстракции, два контроля амплификации).

2. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь из расчета по 10 мкл **ПЦР-смеси-1-FRT МТС**, 5 мкл **ПЦР-буфера-Flu**, 0,5 мкл **полимеразы (TaqF)** и 0,5 мкл **Фермента UDG** на одну реакцию. Полученную реакционную смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
3. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
5. 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**.

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

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

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5, 6, 7).

Таблица 5

Программа амплификации «95-65-72 МТС» для приборов роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия))

| 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 ⁹ | |
| | 72 | 15 с | – | |

Таблица 6

Программа амплификации «95-65-72 МТС» для приборов планшетного типа (например, iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия))

| 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 ¹⁰ | |
| | 72 | 15 с | – | |

Таблица 7

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

| Цикл | Температура, °С | Время | Измерение флуоресценции | Кол-во циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------|---------------|
| 1 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 20 с | – | 45 |
| | 65 | 50 с | Optics ON | |
| | 72 | 20 с | – | |

⁹ Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Измерение флуоресценции по каналам ROX и Cy5 не производится при работе на двухканальных приборах, или если в лаборатории не предполагается использование тестов для количественного определения и дифференцирования до вида *Mycobacterium tuberculosis complex*.

¹⁰ Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Измерение флуоресценции по каналам ROX и Cy5 не производится при работе на двухканальных приборах, или если в лаборатории не предполагается использование тестов для количественного определения и дифференцирования до вида *Mycobacterium tuberculosis complex*.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

См. также **методические рекомендации** по применению набора реагентов для обнаружения микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MTC-FL» вариант FRT ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются после окончания работы амплификатора с помощью программного обеспечения используемого прибора, используя установки, указанные во **вкладыше** к «ПЦР-комплекту» для соответствующего прибора.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (Ct или Cp) в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла (Ct или Cp) для данного канала менее указанного, **отрицательным** – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения Ct или Cp), **сомнительным** во всех остальных случаях.

Положительный результат по каналу **FAM**¹¹ свидетельствует

¹¹ Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

о наличии в образце ДНК *M.tuberculosis complex*, по каналу JOE¹¹ – об адекватном прохождении этапов экстракции и амплификации ВКО.

Оценка результатов анализа контрольных точек.

Результат считается достоверным только в случае соответствия прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК данным таблицы (см. табл. 8).

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Результат амплификации по каналу | |
|----------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------|
| | | FAM | JOE |
| OK | Экстракция ДНК | отрицательный | положительный |
| K+ | ПЦР | положительный | положительный |
| K- | ПЦР | отрицательный | отрицательный |

Результаты не подлежат учету в случае:

1. Отсутствия положительного сигнала по каналам FAM или JOE в пробе с положительным контролем ПЦР (K+), что может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется повторная амплификация всех отрицательных образцов, при повторном получении аналогичного результата, необходимо повторить исследование этих образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Наличия положительного сигнала по каналу FAM в одном из отрицательных контролей (OK или K-), что может свидетельствовать о контаминации реактивов или исследуемых образцов. В этом случае необходимо повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Отсутствия положительного сигнала по каналу JOE в контрольном образце экстракции (OK), что может свидетельствовать об ошибках на этапе экстракции ДНК. В этом случае необходимо повторить анализ образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

Принцип интерпретации результатов, полученных для исследуемых образцов:

Таблица 9

Интерпретация результатов исследуемых образцов

| FAM | JOE | Валидность результата | Форма выдачи ответа |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|---|
| Положительный | Положительный / отрицательный | Валидный | <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> обнаружена |
| Отрицательный | Положительный | Валидный | <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> не обнаружена |
| Отрицательный / > Ct* | Отрицательный / > Ct* | Невалидный | Невалидный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала |
| > Ct* | Положительный | Невалидный | Сомнительный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала |

* значение > Ct для конкретного прибора см. во **Вкладыше** к ПЦР-комплекту для соответствующего прибора.

В случае получения:

1. Положительного результата по каналу FAM и положительного или отрицательного результата по каналу JOE – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* **обнаружена**.
2. Отрицательного результата по каналу FAM и положительного – по каналу JOE – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* **не обнаружена**.
3. Отрицательного результата или результата > Ct* (для конкретного прибора) по каналам FAM и JOE свидетельствует о невалидном результате. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как **невалидный**, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.
4. Результата > Ct* по каналу FAM и положительного – по каналу JOE – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как **сомнительный**, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов 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. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разупаковать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» и «ДНК-сорб-С» (кроме лизирующего реагента) хранить при температуре от 2 до 25 °С. Лизирующий реагент хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимераза (TaqF), ПЦР-смесь-1-FEP MTC, ПЦР-смесь-1-FRT MTC и фермент UDG (из «ПЦР-комплекта») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FEP MTC и ПЦР-смесь-1-FRT MTC хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® MTC-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹².

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

¹² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Порядок работы

1. **Лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить пробирку **отрицательного контроля экстракции** (ОК) и внести в нее **100 мкл ОКО**, используя наконечники с фильтром.
3. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести **лизирующий раствор** и **ВКО STI-87** из расчета по **300** и по **10 мкл** на пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием. Внести в каждую пробирку с клиническими и контрольным образцами по **310 мкл смеси**, используя наконечники с фильтром.
4. Все образцы тщательно перемешать на вортексе, затем центрифугировать на микроцентрифуге в течение 30 с при 10 тыс g для удаления капель с крышек пробирок.
5. При экстракции ДНК из мочи смесь **лизирующего раствора** и **ВКО STI-87** внести в центрифужные пробирки с осадком материала, ресуспендировать отдельным наконечником с фильтром для каждого образца и перенести в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф».
6. Все образцы прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Если образец растворился не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс g и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.
7. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, оставить в штативе на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
8. Осадить **сорбент универсальный** в пробирках центрифугированием при 5 тыс. g в течение 30 с. Удалить

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
9. Добавить в образцы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс. g на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
 10. Добавить в образцы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс. g на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
 11. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 10, удалить надосадочную жидкость полностью.
 12. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
 13. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
 14. Центрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Образцы готовы к постановке ПЦР. Пробы переносить аккуратно, не взбалтывая **сорбент универсальный**.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить пробирку **отрицательного контроля экстракции** (ОК) и внести в нее **100 мкл ОКО**, используя наконечники с фильтром.
3. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести **раствор для лизиса** и **ВКО STI-87** из расчета по **300** и по **10 мкл** на пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием. Внести в каждую пробирку с клиническими и контрольным образцами по **310 мкл смеси**, используя наконечники с фильтром.
4. Все образцы тщательно перемешать на вортексе, затем центрифугировать на микроцентрифуге в течение 30 с при 10 тыс g для удаления капель с крышек пробирок.
5. При экстракции ДНК из мочи смесь **раствора для лизиса** и **ВКО STI-87** внести в центрифужные пробирки с осадком материала, ресуспендировать отдельным наконечником с фильтром для каждого образца и перенести в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф».
6. Содержимое пробирок прогреть 5 мин при 60 °С в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 12 тыс g.
9. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
10. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

11. Центрифугировать при 12 тыс g в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
13. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
14. Центрифугировать при 12 тыс g в течение 2 мин на микроцентрифуге.
15. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
16. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
17. Добавить в пробирки по **100 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **60 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
18. Центрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК и РНК. Образцы готовы к постановке ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-С»

Порядок работы

1. Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести по **400 мкл буфера для лизирующего реагента**, по **17 мкл лизирующего реагента** и по **10 мкл ВКО STI-87** на каждую пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием.
3. При использовании центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» или гомогенизатора TissueLyser LT:
 - а) Подготовить полипропиленовые завинчивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл или свободностоящие объемом 2,0 мл, соответственно.
 - б) В пробирку **отрицательного контроля экстракции (ОК)** внести **100 мкл ОК**, используя наконечники с фильтром.
 - в) Внести в каждую из подготовленных пробирок с фрагментами ткани и шариками, а также в пробирку ОК, по **425 мкл смеси** отдельными наконечниками с фильтром.
 - г) Поместить пробирки в ротор центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» и установить следующий режим:

| RPm | Vortex | Cycle |
|------|--------|-------|
| 1000 | hard | 140 |
| 0,01 | 20 | stop |

или в ротор гомогенизатора и установить режим: частота 50 Гц, время 2 мин.

- д) Перенести пробирки в термостат и провести инкубирование образцов при температуре 65 °С в течение 10 мин.
4. При использовании фарфоровых ступок для гомогенизации образца ткани:

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- а) Подготовить полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
 - б) В пробирку **отрицательного контроля экстракции (ОК)** внести **100 мкл ОКО**, используя наконечники с фильтром.
 - в) Перенести из ступки в пробирки 20 мкл гомогенизированного образца.
 - г) Инкубировать образцы при температуре 65 °С в течение 1 ч, периодически встряхивая на вортексе (не менее 5 раз).
 - д) Осадить нерастворенные частицы образцов центрифугированием при 12 тыс g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость в объеме 350 мкл очень аккуратно отобрать отдельными наконечниками с фильтром и перенести в новые пробирки объемом 1,5 мл.
5. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, оставить в штативе на 10–15 мин, перемешивая через каждые 2 мин.
 6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс g в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
 7. Добавить в образцы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс g на микроцентрифуге в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
 8. Добавить в образцы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс g на микроцентрифуге. Отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

9. Повторить процедуру отмывки **раствором для отмывки 2**, отобрать надосадочную жидкость полностью.
10. Поместить пробирки в термостат при температуре 64 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
11. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 64 °С на 5–8 мин, периодически (1 раз в мин) встряхивая на вортексе.
12. Центрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (проба ДНК). Образцы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации



Код партии



Максимальное число тестов



Изделие для in vitro диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель