

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

« 13 »

октября

2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «МТБ-КОМ»
для выявления возбудителей туберкулеза *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с ДНК экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87) и амплификации полученной ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». ВКО STI-87 позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции.

Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	ДНК ВКО STI-87

Тест-система содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

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

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК	Предел обнаружения, ГЭ (м.т.)/мл	
		<i>M. tuberculosis</i> (штамм H37 Ra)	<i>M. bovis</i> (штамм BCG)
Смывы с объектов окружающей среды, культуры микроорганизмов	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	5x10 ²	1x10 ³
Моча	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	1x10 ³	1x10 ³
Тканевой (нативный) материал	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-С-М»	1x10 ²	5x10 ²
Тканевой материал в парафиновых блоках	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-С-М»	5x10 ²	1x10 ³

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

Аналитическая специфичность

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

Для определения аналитической специфичности на штаммах различных микроорганизмов (в концентрации не менее чем 5×10^8 ГЭ (м.т.)/мл) тестировали 114 референтных штаммов или культур. Из них 16 входили в состав группы *Mycobacterium tuberculosis complex*, 23 являлись нетуберкулезными микобактериями, 75 принадлежали к другим родам и семействам. Специфичность тест-системы оценивалась по отсутствию положительного результата амплификации ДНК бактерий, не принадлежащих к *Mycobacterium 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*: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG* и др.
- Нетуберкулезные микобактерии: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium rapid*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium terrae* и др;
- Бактерии, принадлежащие к другим родам и семействам: *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia suis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium septicum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium diphtheriae mitis*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium xerosis*, *Cryptococcus*

neiformans, *Eggerthella lenta* (*Eubacterium lentum*), *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter faecalis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* (vancomycin resistant), *Enterococcus faecium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria grayi* (*murrayi*), *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria flava*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Neisseria subflava*, *Neisseria pantoea agglomerans*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Pantoea agglomerans*, *Pasteurella tularensis*, *Peptoniphilus* (*Peptostreptococcus*) *anaerobius*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, клинические изоляты *Staphylococcus aureus* *MRSA*, *Staphylococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus A*, *B*, *C*, *G*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*;

– а также ДНК человека.

Результаты тестирования показали 100 % специфичность.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов неспецифических реакций выявлено не было.

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной лаборатории, одним оператором, с использованием одного оборудования. Условия воспроизводимости – тестирование разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий тест-системы. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава тест-системы и конфигурации анализа, которые позволяют исключить влияние потенциально интерферирующих веществ на результат анализа, полученный методом полимеразной цепной реакции:

- использование специфичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам выявляемых ДНК-мишеней;
- использование экзогенного внутреннего контроля (ВКО STI-87), добавляемого в каждый исследуемый образец на этапе экстракции ДНК, результат амплификации которого учитывается при оценке валидности результатов анализа.

Критерием отсутствия влияния потенциально интерферирующих веществ является валидный результат ПЦР-исследования.

Ввиду указанных особенностей состава тест-системы и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

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

Форма 2 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Примечание – Форма 1 удалена.

СОСТАВ

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT MTC	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,28	2 пробирки
ПЦР-буфер-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	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
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии, и методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с тест-системой только персонал, обученный молекулярно-биологическим методам диагностики и правилам работы в лаборатории в установленном порядке.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая

- стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
 - Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
 - Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
 - Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).
 - Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
 - Не использовать тест-систему, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
 - Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
 - Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
 - Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с

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

образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

(например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

3. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
4. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
5. ТЕ-буфер.
6. Стеклянные шарики, стерильные, для гомогенизации образцов тканей или культур микобактерий (D=3 мм).

Предварительная подготовка исследуемого материала

7. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
8. о-Ксилол химически чистый (хч) для депарафинизации парафиновых блоков.
9. Этанол.
10. Стеклянные шарики, стерильные, для гомогенизации образцов тканей или культур микобактерий (D=3 мм).
11. Металлические шарики, стерильные, для гомогенизации образцов тканей с плотной стромой (D=3 мм).
12. Пастеровская пипетка, пластиковая, стерильная, (например, LAB-Medica, Китай, или аналогичная).
13. Чашка Петри, пластиковая, стерильная, (например, SPL Lifesciences, Корея, или аналогичная).
14. Скальпель хирургический одноразовый, (например, Arxmed, Нидерланды, или аналогичный).
15. Одноразовые полиэтиленовые пакеты с застежкой Zip-lock (например, «Промсервис», Россия, или аналогичные).
16. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
17. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
18. Денситометр для определения мутности бактериальной суспензии (например, Den-1, Biosan, Латвия, или аналогичный).
19. Гомогенизатор для тканевых образцов (например, гомогенизатор TissueLyser LT, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичный) или отдельные для

каждой пробы стерильные инструменты (фарфоровые ступки с пестиками, пинцеты, скальпели, ножницы).

20. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
21. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
22. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
23. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
24. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

27. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»),

- Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
28. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 29. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 30. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.»), ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 31. Центрифуга-вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 32. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 33. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ5/iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), CFX96/CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
 34. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 35. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 36. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

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

ВНИМАНИЕ! Вид биологического материала для ПЦР-исследования определяет ветеринарный врач. При выборе биологического материала необходимо руководствоваться целью исследования, знаниями о патогенезе болезни и действующими регламентирующими документами.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

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

а) Плотные среды – переносят колонии в стеклянные пробирки аналогично работе со стандартом мутности, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе или с помощью стеклянных шариков и специального вортекса.

б) Жидкие среды – используют оригинальный флакон.

Мочу собирают в одноразовые градуированные завинчивающиеся емкости с широким горлом. Объем собранной мочи должен быть не менее - 20 мл.

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

Тканевой (нативный) материал помещают в стерильный пластиковый контейнер.

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

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

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

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

Допускается двукратное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

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

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

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

При инструментальной гомогенизации тканевой материал помещают в одноразовую чашку Петри, одноразовым скальпелем отделяют фрагмент с визуализируемыми патологическими изменениями объемом не более 10 мм^3 (10 мкл). В случае визуализации различных очагов

целесообразно взять несколько образцов ткани. Затем перенести их в одноразовые завинчивающиеся пробирки объемом 2,0 мл, положить в них по 1-2 металлических шарика D = 3 мм и добавить 90 мкл стерильного физиологического раствора.

Парафиновые блоки – вырезают фрагмент ткани одноразовым скальпелем, удаляют парафин с помощью ксилола, а затем освобождаются от ксилола серией отмывок с понижающейся концентрацией этанола (аналогично стандартной гистологической проводке).

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

Допускается хранение предобработанных образцов вышеперечисленного материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

Допускается двукратное замораживание-оттаивание материала.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Экстракция ДНК из исследуемого материала

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

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- а) «ДНК-сорб-В» – из культур микроорганизмов, мочи, смывов с

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

Порядок работы с комплектами реагентов смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Экстракцию ДНК из каждого исследуемого образца необходимо проводить в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**.

Очищенная ДНК может храниться:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 недели;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп», «ДНК-сорб-С-М»

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Аmplификация и детекция продуктов амплификации

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Выбор пробирок для проведения ПЦР 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.

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

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

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

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT МТС;
- 5 мкл ПЦР-буфера-Flu;
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF).

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

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

Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ТЕ-буфера.
- б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ПКО ДНК МТС / STI.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

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

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

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в Приложении 2.

Порядок работы с помощью приборов CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в Приложении 3.

В. Интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Результат ПЦР-исследования не является диагнозом. Оценка результатов исследования проводится ветеринарным врачом в соответствии с целью исследования и действующими регламентирующими документами.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 4

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	ДНК ВКО STI-87

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t).

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 5.

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Приборы роторного типа		Приборы планшетного типа	
		Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора			
		FAM	JOE	FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	≤ 26	отсутствует	≤ 29
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 30	≤ 28	≤ 33	≤ 31

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 6

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Приборы роторного типа		Приборы планшетного типа		Результат
Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора				
FAM	JOE	FAM	JOE	
≤ 35	определено или отсутствует	≤ 38	определено или отсутствует	ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex обнаружена
отсутствует	≤ 28	отсутствует	≤ 31	ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex НЕ обнаружена

Приборы роторного типа		Приборы планшетного типа		Результат
Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				
FAM	JOE	FAM	JOE	
отсутствует или > 35	отсутствует или > 28	отсутствует или > 38	отсутствует или > 31	Невалидный*
> 35	≤ 28	> 38	≤ 31	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае получения аналогичного результата рекомендуется повторное взятие исследуемого материала.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 5. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма. Необходимо повторить амплификацию таких образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, JOE и/или для отрицательного контроля экстракции (OK), по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (ПЦР-буфер-Flu, ПКО ДНК *MTC* / *STI*, TE-буфер, ОКО, ВКО *STI-87*) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-1-FRT *MTC*, полимеразы (*TaqF*)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *MTC* хранить в защищенном от света месте.

Температура хранения вскрытых реагентов соответствует температуре хранения, указанной на этикетках для невскрытых реагентов.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «МТБ-КОМ» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 /Q/ для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

А. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

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

– Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.

- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes /Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 7

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

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

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

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

детекции. Для каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов по каналу FAM/Green:

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект. Уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.03**.

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

Анализ результатов по каналу JOE/Yellow провести

аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 8

Канал	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	0,03	включен	включена	10%
JOE/Yellow	0,05	включен	выключена	15%

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

А. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

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

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

Задать программу амплификации:

Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	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, ROX*, Cy5*	
	72	15 с	–	

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

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке *Users*).
- Для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (МТС.tmo) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Запустить выполнение выбранной программы «95-65-72 МТС» с заданной схемой планшета.

- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для

измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Б. Анализ результатов

- Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:
 - Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
 - Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
- Провести анализ результатов по каналам **FAM** и **JOE**, для каждого канала по отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.
- В режиме анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию) поочередно для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне 15 % от максимального значения флуоресцентного сигнала образца **K+**. При этом пороговая линия должна пересекать только **S**-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

Примечание – Чтобы выделить график образца «К+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.
Вывести на экран таблицу результатов со значениями C_t , нажав кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5).

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

- Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
- В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
- В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Таблица 10

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, HEX, ROX*, Cy5*	
	72	15 с	–	

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

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. 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 кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX, Cy5** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

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

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

Б. Анализ результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

- Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
- В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
- Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем, и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ в последнем цикле амплификации, при этом график флуоресценции K+ имеет характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Примечание – Чтобы выделить график образца «K+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Код партии		Использовать до
	Дата изменения		Предел температуры
	Изготовитель		Не допускать воздействия солнечного света
	Дата изготовления		Знак обращения на рынке РФ
	Осторожно!		