

УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 200__ г № _____



«ФЦНТК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

_____ 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК

микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов (*Mycobacterium tuberculosis* – *Mycobacterium bovis* complex) и дифференциации *Mycobacterium tuberculosis* от *Mycobacterium bovis* методом полимеразной цепной реакции (МИКО-ГЕН)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов МИКО-ГЕН предназначен для выявления ДНК микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов (*Mycobacterium tuberculosis* – *Mycobacterium bovis* complex) и дифференциации *Mycobacterium tuberculosis* от *Mycobacterium bovis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологическом материале человека (мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж, хирургический материал (содержимое туберкуломы)).

1.2. Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов МИКО-ГЕН основан на использовании амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

В наборе МИКО-ГЕН в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В наборах в формате «Flash» и «Real-time» в смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомого фрагмента генома микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов и внутреннего контрольного образца (ВК), мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации фрагмента генома микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2 СОСТАВ НАБОРА

В зависимости от способа детекции результатов амплификации набор выпускается в трёх форматах:

формат «Flash» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора;

формат «Real-time» предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов;

формат «Форез» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Набор состоит из четырех комплектов:

а) комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (Проба-НК), включает:

- лизирующий раствор, 30 мл 1 флакон;
- реагент для преципитации, 40 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №1, 50 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 30 мл 1 флакон;
- буфер для растворения, по 1,25 мл 4 пробирки.

Комплект является универсальным для всех форматов.

б) комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 100 пробирок;
- раствор Таq-полимеразы, по 500 мкл 2 пробирки;
- ПЦР-буфер, 200 мкл 1 пробирка;
- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- положительный контрольный образец, 150 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, внутренний контрольный образец. В наборах форматов «Flash» и «Real-time» в состав смеси для амплификации входят флуоресцентные ДНК-зонды.

ПЦР-буфер включен только в комплекты для набора формата «Flash».

Комплект является специфичным для каждого формата («Flash», Real-time», «Форез»).

в) комплект реагентов для дифференциации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* от *Mycobacterium bovis*:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 100 пробирок;
- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- раствор Таq-полимеразы, по 500 мкл 2 пробирки;
- положительный контрольный образец, 150 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, внутренний контрольный образец.

Комплект выпускается только в формате «Форез».

г) комплект реагентов для детекции ДНК методом электрофореза включает:

- смесь для электрофореза - 1 пакет (16,9 г);
- агарозный гель - 5 пластин.

Комплект используется в наборе формата «Форез».

2.3 Время проведения анализа - 4 ч.

2.4 Набор рассчитан на проведение 100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК микобактерий туберкулеза, ПЦР-детектор (формат «Flash») или детектирующий амплификатор (формат «Real-time») должны регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза (формат «Форез»), должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома микобактерий туберкулеза размером 330 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК микобактерий туберкулеза, ПЦР-детектор (формат «Flash») или детектирующий амплификатор (формат «Real-time») должны регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза (формат «Форез») полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома микобактерий туберкулеза

размером 330 п.н., отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 900 п.н., должна быть отчетливо видна.

При использовании комплекта реагентов для дифференциации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* от *Mycobacterium bovis* в образцах биологического материала, содержащих ДНК *Mycobacterium tuberculosis*, должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома *Mycobacterium tuberculosis* размером 263 п.н.

В образцах биологического материала, содержащих ДНК *Mycobacterium bovis*, полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома *Mycobacterium tuberculosis* размером 263 п.н., должна отсутствовать.

3.2 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА: 200 геном-эквивалентов ДНК микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов на 1 мл образца.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2 Потенциальный риск применения набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

4.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки без талька.

4.5 При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.7 Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

4.8 При использовании набора формата «Форез» для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК, проведения ПЦР и электрофорез следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими принадлежностями.

4.9 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.10 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.11 Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением

дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.12 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

4.13 Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

4.14 При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с набором реагентов МИКО-ГЕН требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор (для форматов «Форез» и «Flash») или детектирующий амплификатор (для формата «Real-time»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный на 50 °С;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000-3000 об/мин;
- холодильник бытовой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-10 мкл, 2,0-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;

- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free" объемом 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;

- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;

- одноразовые перчатки медицинские;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный;
- 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия;
- 1М раствор HCl;
- 5% раствор хлорамина;
- дистиллированная вода.

При работе с набором в формате «Flash» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

При детекции методом электрофореза (формат «Форез») требуются:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1,0 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1,0 мм.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

К пробе мокроты или бронхо-альвеолярному лаважу добавить равный объем 10% трехзамещенного фосфорнокислого натрия $\times 12 \text{ H}_2\text{O}$, интенсивно встряхнуть. Смесь инкубировать в течение 18-24 ч при температуре 37°C , затем нейтрализовать 1М HCl до pH 6,8-7,4 и центрифугировать в течение 20 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость слить в 5% раствор хлорамина для обеззараживания, а суспендированный в дистиллированной воде осадок перенести в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл и использовать для выделения ДНК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Примечание. В случае выпадения осадка в лизирующем растворе флакон прогреть при 65°C до полного растворения осадка.

7.1.1 Промаркировать необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца «К-».

7.1.2 Внести по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.

7.1.3 Добавить в пробирки для исследуемых образцов 100 мкл исследуемого образца. В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.

7.1.4 Плотно закрыть крышки пробирок, перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.5 Термостатировать исследуемые образцы и «К-» при 65 °С в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

7.1.6 Добавить 400 мкл реагента для преципитации, перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.7 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.

7.1.8 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.9 Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.10 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.11 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.12 Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.13 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.14 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.15 Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 65 °С в течение 5 мин.

7.1.16 Добавить к осадку 50 мкл буфера для растворения и прогреть пробирки при 65 °С в течение 10 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Препарат ДНК можно хранить при минус 20 °С в течение 1 месяца или при минус 70 °С в течение 1 года.

Для выявления ДНК микобактерий туберкулеза проводят полимеразную цепную реакцию (п.7.2) с комплектом для ПЦР-амплификации ДНК микобактерий туберкулеза (M.Tuberculosis – M. Bovis complex). В случае положительного результата (п.8-9) препарат ДНК (п.7.1) используют для дифференциации *Mycobacterium tuberculosis* от *Mycobacterium bovis* с помощью комплекта реагентов для дифференциации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* от *Mycobacterium bovis*. Для этого необходимо повторить п.7.2 (проведение полимеразной цепной реакции), п.8.4. (регистрация результатов с помощью электрофореза), п.9.2.5 (учёт результатов электрофореза).

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Пп. 7.3.1-7.3.3 выполняются в зоне приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР (МУ 1.3.1888-04).

7.3.1 Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, с учетом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркировать дополнительно две пробирки (ФОН) для контроля фона флуоресценции.

7.3.2 Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок ФОН), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные ФОН, добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.3.3 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.

7.3.4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК из биологического материала.

7.3.5 Внести в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», ФОН).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить препараты ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.3.6 В пробирку, промаркированную «К-», внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.7 В пробирки, промаркированные ФОН, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1).

7.3.8 Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 с.

7.3.9 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл (табл.1-4).

Таблица 1. Формат «Flash». Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»). Алгоритм регулирования: «точный».

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °С	1 мин	1
2.	94 °С 67 °С	5 с 15 с	5
3.	94 °С 67 °С	1 с 15 с	40
4.	10 °С	Хранение	

Таблица 2. Формат «Real-time»
Режим амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С 94 °С	1 мин 1 мин 30 с	1
2.	94 °С 64 °С*	30 с 15 с	5
3.	94 °С 64 °С*	10 15	45
4.	10 °С	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 3. Формат «Real-time»
Режим амплификации для амплификатора
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Режим для dynamicwf.tmo			
№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С 94 °С	1 мин 1 мин 30 с	1
2.	94 °С 64 °С	30 с 45 с	5
3.	80 °С*	30 с	2
Режим амплификации			
1.	94 °С 64 °С*	10 с 45 с	45
2.	10 °С	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 4. Формат «Форез». Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»). Алгоритм регулирования: «точный».

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °C	1 мин 30 с	1
2.	94 °C	20 с	5
	67 °C	5 с	
	72 °C	5 с	
3.	94 °C	5 с	40
	67 °C	5 с	
	72 °C	5 с	
4.	10 °C	Хранение	

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2-8 °С в течение 5 суток.

Примечание: При работе с наборами в формате «Flash» готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки хранить при 2-8 °С в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25 °С), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ДЕТЕКТОРА

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ АМПЛИФИКАТОРОВ ДТ-322, ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322, ДТ-96). ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации фрагмента генома микобактерий туберкулеза и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

8.3 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ICYCLER IQ (BIO-RAD LABORATORIES)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ). ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации фрагмента генома микобактерий туберкулеза и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

8.4 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

8.4.1 Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки.

После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в емкости с водопроводной водой.

8.4.2 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объемом 1 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18-25 °C) в течение 1 недели или при температуре 2-8 °C в течение 1 мес.

8.4.3 Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.4.4 Осторожно ввести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор.

8.4.5 Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.4.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.4.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.4.8 Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА ИЛИ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА

9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

9.1.2 В биологических образцах, содержащих ДНК микобактерий туберкулеза (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта.

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих ДНК микобактерий туберкулеза:

- программа ПЦР-детектора при положительном результате амплификации внутреннего контрольного образца фиксирует отрицательный результат;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта.

9.1.4 Результат оценивается как недостоверный в случае:

- отрицательного результата на наличие ДНК микобактерий туберкулеза и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор);
- отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта и для внутреннего контрольного образца (детектирующий амплификатор).

Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.1.5 Программа ПЦР-детектора фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6 При получении положительного результата (ПЦР-детектор) или экспоненциального роста флуоресценции (детектирующий амплификатор) для специфического продукта в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

9.2.1 В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета на уровне полосы положительного контрольного образца, соответствующие фрагменту генома микобактерий туберкулеза размером 330 п.н. Наличие или отсутствие полосы, соответствующей внутреннему контрольному образцу, в этом случае в учет не принимают.

9.2.2 В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома микобактерий туберкулеза размером 330 п.н., должны отсутствовать, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 900 п.н., должна быть отчетливо видна.

9.2.3 В случае отсутствия в исследуемом образце полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома вируса микобактерий туберкулеза размером 330 п.н., и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 900 п.н., результат считают недостоверным.

Недостоверный результат может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением

протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.2.4 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту генома специфичного продукта, в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

При использовании комплекта реагентов для дифференциации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* от *Mycobacterium bovis*:

9.2.5 В биологических образцах, содержащих ДНК *Mycobacterium tuberculosis* должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, на уровне полосы положительного контрольного образца, размером 263 п.н. В биологических образцах, содержащих *Mycobacterium bovis*, дорожка в геле должна быть пустая.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Срок годности набора – 6 мес.

10.2 Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала, ПЦР-амплификации и детекции ДНК методом электрофореза следует хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

10.3 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.4 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- буферный раствор для электрофореза хранить при температуре 18-25 °С не более 7 дней или при температуре 2-8 °С не более 1 мес.

10.5 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.6 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора МИКО-ГЕН, следует обращаться в ЗАО «НПФ ДНК-Технология» по адресу:

115478, Москва, Каширское ш., д. 23-5, офис 16

телефон/факс (495) 980-45-55

Ведущий научный сотрудник
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук

Т.В.Петрова

«16» июля 2008 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Ведущий научный сотрудник
ГНЦ «Институт иммунологии
ФМБА России»



И. Федосеева

«16» июля 2008 г.