

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации


Г. Г. Онищенко

«22» 04 2009 г.

№ 01-11/41-09

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Амплитуб-МЛУ-РВ»

набора реагентов для определения лекарственной устойчивости
микобактерий туберкулезного комплекса к изониазиду и рифамицину
методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, набор
диагностический

Москва 2008

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК им.Л.А.Тарасевича
Роспотребнадзора

Н.В.Медуницын

«03» 09 2009 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиТуб-МЛУ-РВ» предназначен для определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулезного комплекса к рифампицину и изониазиду в бактериальной культуре и клиническом материале (пробах мокроты, промывных водах бронхов, экссудатах, спинномозговой жидкости, пунктатах и пр.) методом ПЦР-РВ с праймерами, специфичными в отношении фрагментов ДНК генов *rpoB*, *katG* и *inhA* микобактерий туберкулезного комплекса, с целью диагностики форм туберкулеза с лекарственной устойчивостью, в том числе множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), и оценки эффективности проводимой терапии.

1.2. Каждый комплект набора предназначен для выявления мутаций в определенных кодонах генов, ответственных за устойчивость к рифампицину или изониазиду.

1.3. Область применения набора – клиническая медицина (лабораторная диагностика).

2. СОСТАВ

Набор состоит из нескольких комплектов реагентов.

Комплект № 1 предназначен для проведения мультиплексной ПЦР-РВ с целью накопления специфических фрагментов ДНК генов *rpoB*, *katG* и *inhA* микобактерий туберкулезного комплекса.

Комплекты № 2 – 6 позволяют выявлять определенные мутации в 531, 526, 516 и 533 кодонах гена *rpoB*, ассоциирующиеся с устойчивостью к рифампицину.

Комплекты № 7-8 позволяют выявлять мутации в 315 кодоне гена *katG* и замену С209Т в регуляторном регионе гена *inhA*, ассоциирующиеся с устойчивостью к изониазиду.

2.1. Комплект № 1

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь multi	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-multi	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

2.2. Комплект № 2

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь groB531	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-groB	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1-531Alm1	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
4.	Положительный контрольный образец, ПКО2-531Alm1	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО1-531Alm2	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
6.	Положительный контрольный образец, ПКО2-531Alm2	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
7.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

2.3. Комплект № 3

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь groB526-1	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-groB	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1-526Alm3	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
4.	Положительный контрольный образец, ПКО2-526Alm3	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО1-526Alm4	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
6.	Положительный контрольный образец, ПКО2-526Alm4	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
7.	Положительный контрольный образец, ПКО1-526Alm5	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
8.	Положительный контрольный образец, ПКО2-526Alm5	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

9.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
----	---	--------------------------------	--------	------------

2.4. Комплект № 4

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь гpoB526-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-гpoB	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1-526Alm6	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
4.	Положительный контрольный образец, ПКО2-526Alm6	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО1-526Alm7	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
6.	Положительный контрольный образец, ПКО2-526Alm7	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
7.	Положительный контрольный образец, ПКО1-526Alm8	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
8.	Положительный контрольный образец, ПКО2-526Alm8	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
9.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

2.5. Комплект № 5

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь гpoB516	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-гpoB	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1-516Alm9	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
4.	Положительный контрольный образец, ПКО2-516Alm9	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО1-516Alm10	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
6.	Положительный контрольный образец, ПКО2-516Alm10	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
7.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

2.6. Комплект № 6

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь groB533	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-groB	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1-533Alm11	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
4.	Положительный контрольный образец, ПКО2-533Alm11	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
5.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

2.7. Комплект № 7

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь katG	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО- katG	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1- katGAlm12	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
4.	Положительный контрольный образец, ПКО2- katGAlm12	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО1- katGAlm13	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
6.	Положительный контрольный образец, ПКО2- katGAlm13	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
7.	Положительный контрольный образец, ПКО1- katGAlm14	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
8.	Положительный контрольный образец, ПКО2- katGAlm14	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
9.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

2.8. Комплект № 8

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь inhA	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО- inhA	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1- inhAAlm15	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

4.	Положительный контрольный образец, ПКО2- inhAAlm15	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка
5.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл	1 пробирка

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность анализа – 99-100%.

3.2. Набор позволяет выявлять 90-100% образцов, устойчивых к рифампицину и изониазиду от общего числа потенциально устойчивых.

3.3. Пороговая концентрация клеток МБТ в образце для анализа лекарственной чувствительности составляет 5×10^2 /в пробе.

3.4. Время анализа для определения лекарственной чувствительности/устойчивости микобактерий к рифампицину и изониазиду – 1-3 дня.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Исследования материала на наличие микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР-РВ проводят в учреждениях, имеющих разрешение на работу с возбудителями III-IV группы патогенности.

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

4.3. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4. Анализ с помощью набора должен производиться в ПЦР-лаборатории, организованной согласно Методическим указаниям (МУ 1.3.1888-04) «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала,

инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

4.5. Работу с набором реагентов и анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька. При каждой операции использовать и менять одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (хромпик, щелочь или ДП-2Т).

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

4.7. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР-РВ, до начала и после завершения работ необходимо обрабатывать бактерицидными облучателями.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения ПЦР-РВ анализа требуется:

- настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф;
- амплификатор для ПЦР-РВ;
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 0,5 мл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл;
- набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые медицинские перчатки;
- штативы для наконечников, микропробирок на 0,2 и 0,5 мл;
- емкость с дезинфицирующим средством ;
- холодильник на 2-8 °С и на минус 20 °С.

6. ОПИСАНИЕ МЕТОДА АНАЛИЗА

Определение лекарственной устойчивости с помощью тест-системы основано на оригинальном методе мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР-РВ, позволяющем выявлять мутации в генах микобактерий туберкулеза, ответственных за чувствительность к конкретным лекарственным препаратам.

Аллель-специфичная ПЦР (АС-ПЦР) основана на том положении, что для эффективной ПЦР 3'-концевой нуклеотид праймера должен быть комплементарен соответствующему нуклеотиду ДНК-матрицы, в противном случае эффективность удлинения праймера во время ПЦР резко снижается или может отсутствовать совсем. АС-ПЦР позволяет получать информацию не только о наличии мутации в геномной ДНК, но и ее аллельном распределении. Мультиконкурентная АС-ПЦР в реальном времени основана на конкурентном встраивании аллель-специфичных праймеров с различными нуклеотидами на 3'-конце.

В реакционной смеси ПЦР-РВ содержатся прямой и обратный праймеры, гибридизационный флуоресцентный зонд, не содержащие мутаций, а также 5'-флуоресцентно-меченные аллель-специфичные праймеры, несущие на 3'-конце определенные нуклеотидные замены, и общий комплементарный аллель-специфичным праймерам 3'-меченный олигонуклеотид-гаситель. Каждый аллель-специфичный праймер со своей нуклеотидной заменой мечен своим флуоресцентным красителем, что позволяет по мере накопления продукта реакции определять его присутствие в исходной ДНК по изменению флуоресценции. В одной пробирке одновременно можно определять до трех точек мутаций (зонд + 3 аллель-специфичных праймера) по числу возможных флуорофоров, одновременно считываемых прибором. *Если анализируемый образец не содержит мутаций*, то будет идти ПЦР-РВ с прямым и обратным праймерами, не мечеными и не содержащими мутаций, и нарастание флуоресценции будет наблюдаться только по флуорофору гибридизационного зонда. *Если образец содержит мутацию*, то нарастание флуоресценции будет наблюдаться и по флуорофору гибридизационного зонда, и по флуорофору 5'-флуоресцентно-

меченного аллель-специфичного праймера, который будет встраиваться вместо обычного праймера, не содержащего мутаций.

Гибридизационный флуоресцентный зонд, не содержащий мутаций, является маркером присутствия искомого специфического фрагмента и играет роль внутреннего контроля, контролируя возможное ингибирование реакции в целом. Интерпретация результатов анализа по флуоресценции в приборе ПЦР-РВ представлена на рисунке 1.

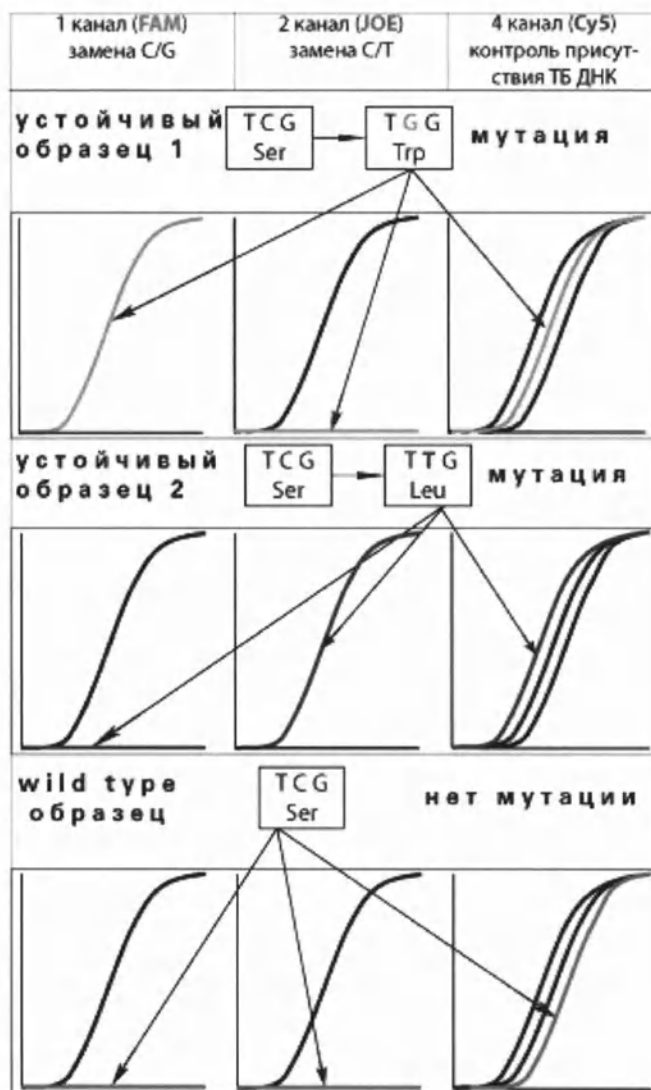


Рис. 1. Пример анализа детекции мутаций *M.tuberculosis* в кодоне 531 гена *groB* при измерении флуоресценции в 4-х каналах прибора для ПЦР в реальном времени АНК-32: 1 канал - детекция флуорофора аллель-специфичного праймера, содержащего мутацию Ser-Trp; 2 канал - детекция флуорофора аллель-специфичного праймера, содержащего мутацию Ser-Leu; 4 канал - детекция флуоресценции зонда.

Комментарий к примеру. На 2-х верхних рисунках выделены кривые флуоресценции по трем каналам для образцов, содержащих две разные мутации. Для первого образца флуоресценция наблюдается по 1 каналу (от встроенного флуоресцентно-меченного аллель-специфичного праймера на мутацию Ser-Trp) и 4 каналу (флуоресценция гибрида зонда). Для второго образца флуоресценция наблюдается по 2 каналу (от встроенного флуоресцентно-меченного аллель-специфичного праймера на мутацию Ser-Leu) и 4 каналу (флуоресценция гибрида зонда). На нижнем рисунке выделены кривые флуоресценции для чувствительного образца: подъем флуоресценции наблюдается только по 4 каналу (флуоресценция гибрида зонда). Правый столбец рисунка демонстрирует только флуоресценцию гибрида зонда (контроль присутствия ДНК микобактерий туберкулезного комплекса).

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ МУТАЦИИ

Гены, кодоны, замены, тестируемые с помощью набора, представлены в табл. 1.

Таблица 1.

кодоны	Замены	Число пробирок в ПЦР-РВ
<i>rpoB</i> (рифампицин)		
531	2 замены Ser – Leu TCG – TTG Ser – Trp TCG – TGG	1 комплект № 2
526	6 замен His – Tyr CAC – TAC His – Asp CAC – GAC His – Leu CAC – CTC His – Arg CAC – CGC His – Asn CAC – AAC His – Pro CAC – CCC	2 комплекты № 3, 4
516	2 замены Asp – Val GAC – GTC Asp – Tyr GAC – TAC	1 комплект № 5
533	1 замена Leu – Pro CTG – CCG	1 комплект № 6
<i>katG</i> и <i>inhA</i> (изониазид)		
<i>katG</i> 315	3 замены Ser – Thr AGC – ACC Ser – Asn AGC – AAC Ser – Thr AGC – ACA	1 комплект № 7
<i>inhA</i> 209	1 замена C209T	1 комплект № 8

8. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа на лекарственную устойчивость допускаются образцы культур микобактерий туберкулезного комплекса с содержанием 10^2 и выше клеток в 5 мкл образца ДНК, а также клинические образцы (мокроты и пр.) с содержанием клеток микобактерий туберкулеза 5×10^2 и выше в 5 мкл образца ДНК.

Пробоподготовка образцов осуществляется с помощью комплекта № 1 для выделения ДНК набора реагентов «АмплиТуб-РВ» (ЗАО «Синтол») в зависимости от вида образца в соответствии с инструкцией к набору. Все выделенные образцы анализируются с помощью комплекта № 2 для проведения

ПЦР-РВ набора реагентов «АмплиТуб-РВ» для обнаружения и количественного определения ДНК МБТ методом ПЦР-РВ «АмплиТуб-РВ» (ЗАО «Синтол») с целью идентификации и дифференциации по количественному содержанию клеток микобактерий туберкулеза. Отобранные по количественному критерию образцы можно использовать для анализа на лекарственную устойчивость к рифампицину и изониазиду набором «Ампли Туб-МЛУ-РВ».

Образцы культур с содержанием клеток микобактерий туберкулеза 10^4 и выше в 5 мкл образца ДНК анализируют на лекарственную устойчивость с помощью комплектов № 2 – 8 (без проведения мультиплексной ПЦР-РВ комплектом № 1), а культуры с содержанием клеток микобактерий туберкулеза $10^4 - 10^2$ в 5 мкл образца ДНК и все образцы мокроты с содержанием клеток микобактерий туберкулеза 5×10^2 и выше в 5 мкл образца ДНК анализируют с помощью комплектов № 1 – 8 (с проведением предварительно мультиплексной ПЦР-РВ для накопления специфических фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA* микобактерий туберкулезного комплекса).

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед началом работы с набором реагентов «АмплиТуб-МЛУ-РВ» необходимо создать в программе прибора протоколы, устанавливающие температурные режимы и необходимые красители, настроить параметры программы *Excel* и упорядочить файлы.

Подробный порядок работы на приборе АНК-32 (Россия) и создание протоколов в программе прибора изложен в приложении 1. Организация отчетных файлов и анализ результатов исследования в программе Excel с помощью специального шаблона для автоматической обработки данных описан в приложении 2.

9.1. Этапы анализа.

Анализ определения лекарственной устойчивости набором «АмплиТуб-МЛУ-РВ» включает три этапа:

- проведение мультиплексной ПЦР-РВ с помощью комплекта № 1;

- определение лекарственной устойчивости образцов к рифампицину с помощью комплектов № 2-6;
- определение лекарственной устойчивости образцов к изониазиду с помощью комплектов № 7-8.

На первом этапе с помощью комплекта реагентов № 1 проводится мультиплексная ПЦР-РВ с целью накопления специфических фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, в которых могут содержаться мутации, ассоциирующиеся с лекарственной устойчивостью к рифампицину и изониазиду.

Второй этап анализа включает определение лекарственной устойчивости образцов к рифампицину (комплекты № 2 – 6). Все комплекты подразумевают обнаружение конкретных мутаций в определенных кодонах (531, 526, 516, 533) гена *rpoB*, ассоциирующихся с устойчивостью к рифампицину. Для анализа были выбраны 11 мутаций, наиболее часто встречающиеся и обеспечивающие диагностическую чувствительность 90-100%.

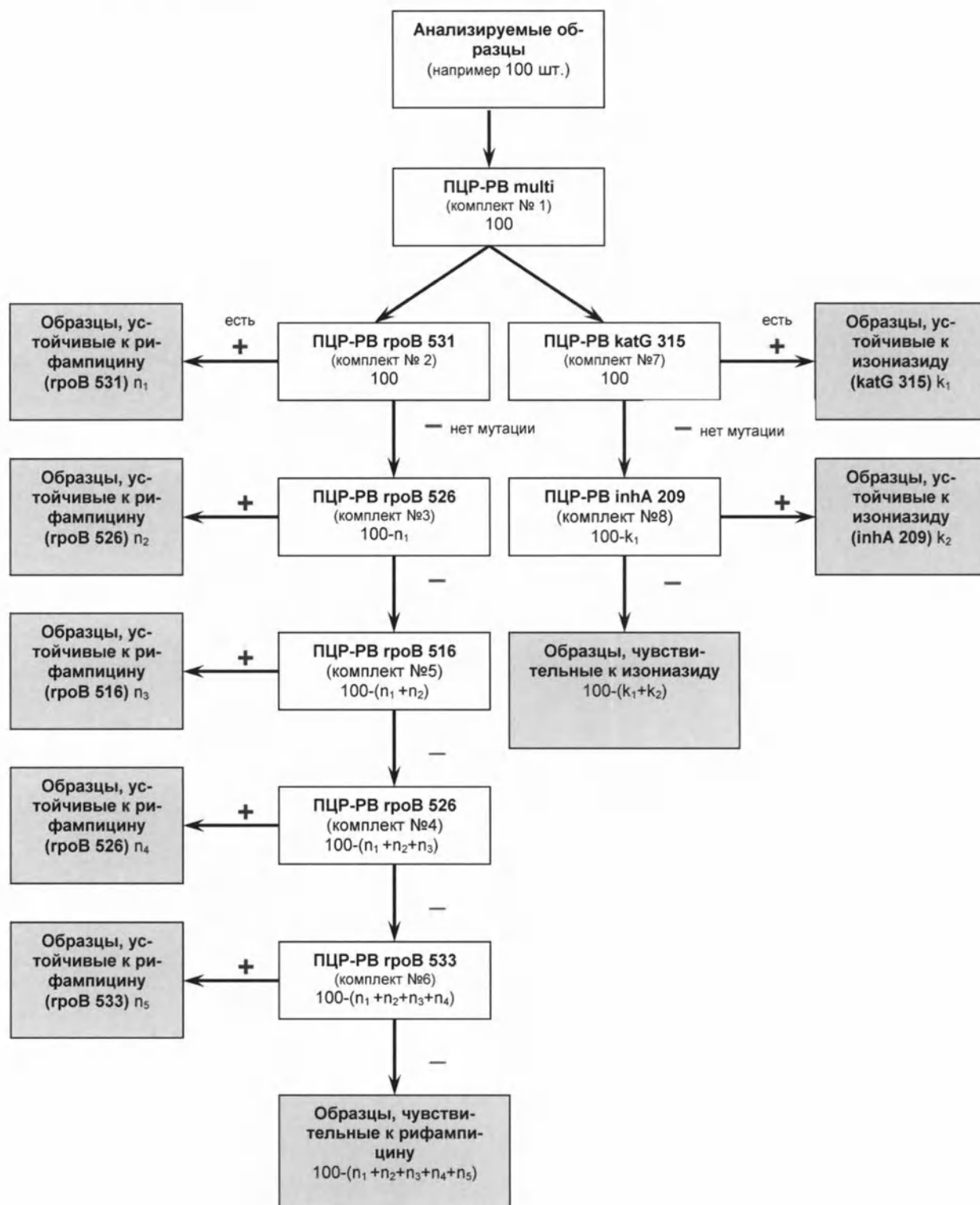
Температурные режимы ПЦР-РВ для комплектов № 2 – 6 одинаковы, что позволяет работать с комплектами как последовательно, так и параллельно, в зависимости от количества исследуемых образцов. Последовательность (нумерация) комплектов определена в соответствии с вероятностью обнаружения мутаций, т.е. мутации в 531 кодоне *rpoB* гена чаще встречаются, чем в 526 или 516 кодонах. Таким образом, при большом числе образцов и/или последовательной работе с комплектами мы рекомендуем соблюдать их последовательность. Это, во-первых, упростит постановку и интерпретацию результатов ПЦР-РВ, и, во-вторых, уменьшит расход реагентов и время анализа на лекарственную устойчивость.

Третий этап анализа – определение лекарственной устойчивости к изониазиду (комплекты № 7 – 8). Комплект № 7 позволяет обнаруживать мутации в 315 кодоне *katG* гена, а комплект № 8 – замену С209Т в регуляторном регионе *inhA* гена.

Рекомендуется проводить последовательный анализ образцов на антибиотикоустойчивость согласно представленному ниже алгоритму: для всех образ-

цов обязательными являются реакции **multi**, **rpoB531** и **katG315**. Для чувствительных образцов анализ продолжается с последовательным использованием комплектов.

Алгоритм анализа образцов на определение устойчивости к рифампицину и изониазиду с помощью набора «АмплиТуб-МЛУ-РВ»



Анализ с помощью комплектов № 1-8 набора «АмплиТуб-МЛУ- РВ» включает в себя:

1. Подготовку к проведению реакции ПЦР-РВ.
2. Проведение реакции ПЦР-РВ.
3. Учет и обработку результатов с помощью программы Excel.
4. Анализ результатов и выводы.

9.2. Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ.

Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ для всех комплектов набора одинакова.

В каждую постановку обязательно включают положительные (ПКО) и отрицательные (ОКО) контрольные образцы ПЦР. **При параллельном использовании комплектов включение в постановку всех входящих в комплект ПКО обязательна, если в данной постановке используется этот комплект!**

Реакцию с каждым исследуемым образцом (ИО) рекомендуется ставить в двух повторях.

1. Взять необходимое количество пробирок с реакционной смесью комплекта для амплификации из расчета $2 \cdot N + K$ (если исследуемые образцы ставятся в двух повторях) или $N + K$ (если исследуемые образцы ставятся однократно), где N – количество исследуемых образцов, а K – количество контрольных образцов в данном комплекте. Не допускать размораживания и повторного замораживания оставшихся пробирок со смесью.
2. После размораживания реакционной смеси, центрифугировать пробирки 30-60 секунд (скорость вращения ротора более 4000 об./мин. или 2500g). Для этого воспользоваться либо ротором для пробирок 0,2 мл, либо адаптерами к стандартному ротору для пробирок 2,0 мл.

3. Поместить пробирки с реакционной смесью в штатив. Маркировать пробирки в соответствии с протоколом исследования в верхней части стенки пробирки.

Примечание Запрещается наносить маркировку на крышку пробирок.

4. Положительные и отрицательные контрольные образцы ПЦР и исследуемые образцы разморозить, перемешать на встряхивателе (вортексе) и центрифугировать.
5. Внести в пробирки по 5 мкл отрицательных контрольных образцов, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, положительных контрольных образцов ДНК МБТ в соответствии с маркировкой, используя наконечники с аэрозольным барьером, перемешать на встряхивателе и центрифугировать.
6. Поместить пробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования.

А. Мультиплексная ПЦР-РВ (Комплект № 1 «Multi»)

Проведение мультиплексной ПЦР-РВ – комплект № 1 «Multi» - первый этап анализа образцов, содержащих микобактерии туберкулезного комплекса и отобранных по количественному содержанию клеток МБТ (см. п. «Анализируемые образцы»).

С целью предотвращения контаминации режим амплификации мультиплексной ПЦР-РВ специально включает только **20 циклов**, когда рост флуоресценции обычно еще не регистрируется прибором. Поэтому **ПКО-multi** является только внешним контролем работы реагентов. Пробирка с ПКО-multi после окончания реакции амплификации выбрасывается. Исследуемые образцы после постановки мультиплексной ПЦР-РВ разводят в тех же пробирках в **5 раз** деионизированной водой.

Полученная смесь является исходной для дальнейшей постановки всех реакций ПЦР-РВ с помощью комплектов № 2 – 8!

Рекомендуется использовать следующий порядок образцов в комплекте № 1 «Multi»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-multi
2	ОКО
3	исследуемый образец 1
4	исследуемый образец 2
5	исследуемый образец 3
...	
32	исследуемый образец N

Б. Определение устойчивости к рифампицину (комплекты № 2-6 «гpoB»)

Для корректной работы шаблонов для автоматической обработки результатов необходимо использовать следующий порядок образцов:

в комплекте № 2 «гpoB 531»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-гpoB
2	ПКО1-Alm1
3	ПКО2-Alm1
4	ПКО1-Alm2
5	ПКО2-Alm2
6	ОКО
7	исследуемый образец 1
8	исследуемый образец 1
9	исследуемый образец 2
10	исследуемый образец 2
...	
31	исследуемый образец N
32	исследуемый образец N

в комплекте № 3 «гpoB 526-1»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-гpoB
2	ПКО1-Alm3
3	ПКО2-Alm3
4	ПКО1-Alm4
5	ПКО2-Alm4
6	ПКО1-Alm5
7	ПКО2-Alm5
8	ОКО
9	исследуемый образец 1
10	исследуемый образец 1
11	исследуемый образец 2
12	исследуемый образец 2
...	
31	исследуемый образец N
32	исследуемый образец N

в комплекте № 4 «гpoB 526-2»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-гpoB
2	ПКО1-Alm6
3	ПКО2-Alm6

4	ПКО1-Аlm7
5	ПКО2-Аlm7
6	ПКО1-Аlm8
7	ПКО2-Аlm8
8	ОКО
9	исследуемый образец 1
10	исследуемый образец 1
11	исследуемый образец 2
12	исследуемый образец 2
...	
31	исследуемый образец N
32	исследуемый образец N

в комплекте № 5 «гpoB 516»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-гpoB
2	ПКО1-Аlm9
3	ПКО2-Аlm9
4	ПКО1-Аlm10
5	ПКО2-Аlm10
6	ОКО
7	исследуемый образец 1
8	исследуемый образец 1
9	исследуемый образец 2
10	исследуемый образец 2
...	
31	исследуемый образец N
32	исследуемый образец N

в комплекте № 6 «гpoB 533»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-гpoB
2	ПКО1-Аlm11
3	ПКО2-Аlm11
4	ОКО
5	исследуемый образец 1
6	исследуемый образец 1
7	исследуемый образец 2
8	исследуемый образец 2
...	
31	исследуемый образец N
32	исследуемый образец N

В. Определение устойчивости к изониазиду (комплекты № 7-8 «katG», «inh»)

Рекомендуется использовать следующий порядок образцов
в комплекте № 7 «katG 315»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-katG
2	ПКО1-katGAIm12
3	ПКО2-katGAIm12
4	ПКО1-katGAIm13
5	ПКО2-katGAIm13
6	ПКО1-katGAIm14
7	ПКО2-katGAIm14

8	ОКО
9	исследуемый образец 1
10	исследуемый образец 1
11	исследуемый образец 2
12	исследуемый образец 2
...	
31	исследуемый образец N
32	исследуемый образец N

в комплекте № 8 «inhA»:

№ ячейки	Образец
1	ПКО-inhA
2	ПКО1-inhAAIm15
3	ПКО2-inhAAIm15
4	ОКО
5	исследуемый образец 1
6	исследуемый образец 1
7	исследуемый образец 2
8	исследуемый образец 2
...	
31	исследуемый образец N
32	исследуемый образец N

9.3. Проведение реакции ПЦР-РВ

Реакцию ПЦР-РВ проводят согласно инструкции по эксплуатации прибора АНК-32, АНК-64 или АНК-96.

- 1) Включают прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
- 2) Запускают программу «АНК32.exe».
- 3) Выбирают режим работы «Циклический».
- 4) В окне «Циклический» вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблицам 2 - 4 и вводят красители (**FAM, JOE/R6G, ROX, Cy5**) согласно таблице 5. При одновременном использовании комплектов № 2 – 6 или комплектов № 7 – 8 рекомендуется сразу включать красители по всем четырем каналам.

Таблица 2 – Температурно-временной режим амплификации для комплекта №1 (мультиплексная ПЦР-РВ)

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °C – 5 мин	1
2	66 °C – 50 с	20
3	95 °C – 20 с	

Таблица 3 – Температурно-временной режим амплификации для комплектов №2 – 6 (определение устойчивости к рифампицину)

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °С – 5 мин	1
2	58 °С – 50 с	40
3	95 °С – 20 с	

Таблица 4 – Температурно-временной режим амплификации для комплектов №7 – 8 (определение устойчивости к изониазиду)

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °С – 5 мин	1
2	62 °С – 50 с	40
3	95 °С – 20 с	

Таблица 5 – Красители, вводимые для комплектов № 1 – 8

№ комплекта	Красители	Выявление
1	FAM, R6G, ROX	Специфические фрагменты генов <i>groB</i> , <i>katG</i> и <i>inhA</i> .
2	FAM, JOE, Cy5	Специфические фрагменты гена <i>groB</i> с заменами в 531 кодоне.
3	FAM, JOE, ROX, Cy5	Специфические фрагменты гена <i>groB</i> с заменами в 526 кодоне.
4	FAM, JOE, ROX, Cy5	Специфические фрагменты гена <i>groB</i> с заменами в 526 кодоне.
5	JOE, ROX, Cy5	Специфические фрагменты гена <i>groB</i> с заменами в 516 кодоне.
6	ROX, Cy5	Специфические фрагменты гена <i>groB</i> с заменой в 533 кодоне.
7	FAM, JOE, ROX, Cy5	Специфические фрагменты гена <i>katG</i> с заменами в 315 кодоне.
8	FAM, R6G	Специфические фрагменты гена <i>inhA</i> с заменой в C209T.

- 5) Вводят сведения об образцах по соответствующему красителю. Нажимают «ОК» в «Сведениях об образцах».

- 6) Начинают работу прибора нажатием кнопки «Старт» и фиксируют в рабочем журнале название файла.
- 7) В соответствии с инструкцией к прибору в окне «Прием Данных» после 11 циклов отключают режим «Реальные» и активируют окно приема сигнала флуоресценции по 1 – 4 измерительному каналу (наличие положительной динамики в какой-либо лунке по определенному каналу свидетельствует о наличии в реакционной смеси специфических фрагментов ДНК и позволяет дать предварительное заключение о соответствующем образце).
- 8) Отработанные пробирки утилизируют в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

Подробный порядок работы на приборе АНК-32 (Россия) изложен в приложении 1.

9.4. Обработка результатов работы прибора

Проводят расчет и сохранение значений порогового цикла для используемых красителей: **FAM, R6G, ROX** - для комплекта № 1; **FAM, JOE, Cy5** - для комплекта № 2; **FAM, JOE, ROX, Cy5** - для комплектов № 3, 4, 7; **JOE, ROX, Cy5** - для комплекта № 5; **ROX, Cy5** - для комплекта № 6; **FAM, R6G** - для комплекта № 8 согласно инструкции к прибору. Далее проводят учет и интерпретацию результатов анализа.

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации прибором **ОКО** (ложноположительный результат);
- в случае отсутствия регистрации прибором **ПКО** (ложноотрицательный результат).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации прибором **ОКО**;
- в случае регистрации прибором **ПКО** по соответствующим каналам.

А. Мультиплексная ПЦР-РВ (Комплект № 1 «Multi»)

Результат анализа по **ПКО-multi** должен удовлетворять следующим условиям:

- результат реакции должен быть положительным по каналам **FAM** (*inhA* ген), **R6G** (*katG* ген), **ROX** (*rpoB* ген).
- значение порогового цикла для всех каналов красителей (FAM, R6G, ROX) должно лежать в диапазоне от 7 до 15 цикла.

Регистрация **ПКО-multi** по красителям **FAM, R6G, ROX** (1 – 3 канал) свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК генов *rpoB*, *katG* и *inhA* МБТ и нормальном прохождении мультиплексной ПЦР-РВ с помощью комплекта № 1.

Б. Определение устойчивости к рифампицину (комплекты № 2-6 «rpoB»)

Результат анализа по **ПКО-rpoB** должен удовлетворять следующим условиям:

- результат реакции должен быть положительным только по каналу **Cy5**.

Регистрация **ПКО-rpoB** по красителю **Cy5** (4 канал) свидетельствует о наличии в образце специфического фрагмента ДНК гена *rpoB*. Так как **ПКО-rpoB** не содержит каких-либо мутаций (олигонуклеотидных замен или делеций), то рост флуоресценции не должен наблюдаться еще по какому-либо красителю, кроме как Cy5, ни в каком комплекте набора.

Результат анализа по **ПКО1-Alm** и **ПКО2-Alm**: результат реакции должен быть положительным только по каналу на соответствующую мутацию (ПКО-Alm1, ПКО-Alm4, ПКО-Alm7, ПКО-Alm10 – **JOE**; ПКО-Alm2, ПКО-Alm5, ПКО-Alm8, ПКО-Alm9, ПКО-Alm11 – **ROX**; ПКО-Alm3, ПКО-Alm6 – **FAM**). Регистрация ПКО-Alm1, ПКО-Alm4, ПКО-Alm7, ПКО-Alm10 – по каналу **JOE**; ПКО-Alm2, ПКО-Alm5, ПКО-Alm8, ПКО-Alm9, ПКО-Alm11 – по каналу **ROX**; ПКО-Alm3, ПКО-Alm6 – по каналу **FAM** свидетельствует о наличии в образце специфического фрагмента ДНК гена *rpoB* МБТ, имеющего в своем составе замену в кодоне и обладающего лекарственной устойчивостью к рифампицину.

В. Определение устойчивости к изониазиду (комплекты № 7-8 «katG», «inh»)

Результат анализа по **ПКО-katG** должен удовлетворять следующим условиям:

- результат реакции должен быть положительным только по каналу **Cy5**.

Так как **ПКО-katG** не содержит каких-либо мутаций (олигонуклеотидных замен или делеций), то рост флуоресценции не должен наблюдаться еще по какому-либо красителю, кроме как **Cy5**.

Результат анализа по **ПКО-inhA** должен удовлетворять следующим условиям:

- результат реакции должен быть положительным только по каналу **R6G**.

Так как **ПКО-inhA** не содержит каких-либо мутаций (олигонуклеотидных замен или делеций), то рост флуоресценции не должен наблюдаться еще по какому-либо красителю, кроме как **R6G**.

Результат анализа по **ПКО1-Alm** и **ПКО2-Alm**: результат реакции должен быть положительным только по каналу на соответствующую мутацию (ПКО- Alm13 – **JOE**; ПКО-Alm14 – **ROX**; ПКО-Alm12, ПКО-Alm15 – **FAM**). Регистрация ПКО- Alm13 – по каналу **JOE**; ПКО-Alm14 – по каналу **ROX**; ПКО-Alm12, ПКО-Alm15 – по каналу **FAM** свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК генов *katG* и *inhA* МБТ, имеющих в своем составе замену в кодоне и обладающих лекарственной устойчивостью к изониазиду.

Организация отчетных файлов и анализ результатов исследования в программе Excel с помощью специального шаблона для автоматической обработки данных описан в приложении 2.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

11.1. Проведение мультиплексной ПЦР-РВ.

Мультиплексная ПЦР-РВ проводится с помощью комплекта реагентов № 1 с целью накопления специфических фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, в ко-

торых могут содержаться мутации, ассоциирующиеся с лекарственной устойчивостью к рифампицину и изониазиду. Контроль за мультиплексной ПЦР-РВ осуществляется с помощью ПКО-multi.

Постановка мультиплексной ПЦР-РВ считается достоверной, если для образца ПКО-multi наблюдался рост флуоресценции по 1 каналу – FAM (inhA), по 2 каналу – R6G (katG) и 3 каналу – ROX (groB). Если по какому-нибудь каналу (1 – 3) результат для ПКО-multi отрицательный, вся постановочная серия мультиплексной ПЦР-РВ считается недостоверной.

Результат анализа ОКО должен быть отрицательным для всех реакций. В случае получения положительных результатов для ОКО по какой-либо реакции результаты дальнейшего определения всех положительных образцов (комплекты № 2-8) могут быть недостоверными.

С целью предотвращения контаминации режим амплификации мультиплексной ПЦР-РВ специально включает только 20 циклов, когда рост флуоресценции обычно еще не регистрируется прибором. Поэтому ПКО-multi является только внешним контролем работы реагентов. Пробирка с ПКО-multi после окончания реакции амплификации выбрасывается. Исследуемые образцы после постановки мультиплексной ПЦР-РВ разводят в тех же пробирках в 5 раз деионизированной водой. Полученная смесь является исходной для дальнейшей постановки всех реакций ПЦР-РВ с помощью комплектов № 2 – 8.

11.2. Определение лекарственной устойчивости к рифампицину.

Определение лекарственной устойчивости образцов к рифампицину проводится с помощью комплектов № 2 – 6.

Образец считается чувствительным (не имеет мутаций в данном кодоне), если:

1. Рост флуоресценции наблюдается только по 4 каналу (Cy5). По 4 каналу (Cy5) регистрируется флуоресценция от флуорофора гибридизационного зонда, который не содержит мутаций и является маркером, контролируя ингибирование

ние реакции и наличие в образце специфического фрагмента гена *groV* микобактерий туберкулезного комплекса.

2. Рост флуоресценции наблюдается по 4 каналу и по одному или нескольким каналам (1 канал - FAM, 2 канал - JOE, 3 канал - ROX) на мутации, однако пороговый цикл флуоресценции (C_t) образца по каналу на мутацию не попадает в диапазон между пороговыми циклами положительных контролей на мутацию ПКО1-Alm и ПКО2-Alm.

Образец считается устойчивым к рифампицину (имеет мутацию в каком-либо кодоне), если:

Рост флуоресценции наблюдается по 4 каналу и по одному или нескольким каналам (1 канал - FAM, 2 канал - JOE, 3 канал - ROX) на мутации. Пороговый цикл флуоресценции (C_t) образца по каналам 1 – 3 должен попадать в диапазон между пороговыми циклами положительных контролей на мутацию ПКО1-Alm и ПКО2-Alm.

В случае отрицательного результата на наличие в образце специфического фрагмента *groV* микобактерий туберкулезного комплекса (4 канал - Cy5) результат считается недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование образца, начиная с постановки реакции на обнаружение и количественное определение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР-РВ с помощью набора «АмплиТуб-РВ» (ЗАО «Синтол»). Если количество микобактерий туберкулезного комплекса в образце ДНК будет определено как 10^4 и выше в 5 мкл, а в реакциях ПЦР-РВ на определение лекарственной устойчивости к рифампицину по прежнему будет наблюдаться отрицательный результат по 4 каналу (Cy5), то возможно наличие в этом образце других, более редких мутаций в других кодонах гена *groV*, выходящих за рамки этого набора.

При получении положительного результата ОКО по какому-либо каналу вся постановочная серия на данный комплект считается недостоверной. В этом случае необходимо повторить постановку и, если это необходимо, провести специальные мероприятия для устранения контаминации.

11.3. Определение лекарственной устойчивости к изониазиду.

Определение лекарственной устойчивости образцов к изониазиду проводится с помощью комплектов № 7 – 8.

Образец считается чувствительным (не имеет мутаций в данном кодоне), если:

1 Рост флуоресценции наблюдается только по 4 каналу (Cy5) для комплекта № 7 или по 2 каналу (R6G) для комплекта № 8. По 4 каналу - Cy5 (комплект № 7) и 2 каналу - R6G (комплект № 8) регистрируется флуоресценция от флуорофоров гибридизационных зондов, которые не содержат мутаций и являются маркерами, контролируя ингибирование реакции и наличие в образце специфических фрагментов генов *katG* и *inhA* микобактерий туберкулезного комплекса.

2 Рост флуоресценции наблюдается по каналу гибридизационного зонда (4 канал (комплект № 7); 2 канал (комплект № 8)) и по одному или нескольким каналам (1 канал - FAM, 2 канал - JOE, 3 канал - ROX) на мутации, однако пороговый цикл флуоресценции (C_t) образца по каналу на мутацию не попадает в диапазон между пороговыми циклами положительных контролей на мутацию ПКО1-Alm и ПКО2-Alm.

Образец считается устойчивым к изониазиду (имеет мутацию в каком-либо кодоне), если:

Рост флуоресценции наблюдается по 4 каналу - Cy5 для комплекта № 7 или по 2 каналу - R6G для комплекта № 8 и по одному или не скольким каналам (1 канал - FAM, 2 канал - JOE, 3 канал - ROX) на мутации. Пороговый цикл флуоресценции (C_t) образца по каналам 1 – 3 должен попадать в диапазон между пороговыми циклами положительных контролей на мутацию ПКО1-Alm и ПКО2-Alm.

В случае отрицательного результата на наличие в образце специфических фрагментов *katG* и/или *inhA* микобактерий туберкулезного комплекса (4 канал - Cy5 – для комплекта № 7; 2 канал – R6G – для комплекта № 8) результат считается недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование образца, начиная с постановки реакции на обнаружение и количественное определе-

ние ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР-РВ с помощью набора «Амплитуб-РВ» (ЗАО «Синтол»), далее – мультиплексной ПЦР-РВ (комплект № 1) и затем – реакции ПЦР-РВ с помощью комплектов № 7 – 8.

При получении положительного результата ОКО по какому-либо каналу вся постановочная серия на данный комплект считается недостоверной. В этом случае необходимо повторить постановку и, если это необходимо, провести специальные мероприятия для устранения контаминации.

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Транспортирование набора «Амплитуб-МЛУ-РВ» должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 всеми видами крытого транспорта при температуре от минус 18 до минус 20 °С, допускается кратковременное, не более трех суток, транспортирование при температуре от 2 до 8 °С.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Набор реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ» следует хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре от минус 18 до минус 20 °С в течение всего срока годности набора.

14. СРОК ГОДНОСТИ 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

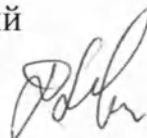
Рекламации на качество наборов направлять в ФГУН Государственный
НИИ стандартизации и контроля медицинских и иммунологических препаратов
(ГИСК) им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора по адресу: 119002, Москва, пер.
Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22 и на предприятие-изготовитель ЗАО
«Синтол» по адресу: 127550, Москва, Тимирязевская ул., 42, тел. (495) 506-79-
97.

Генеральный директор
Предприятия-изготовителя
ЗАО «Синтол»



А.В.Кузубов

Руководитель Государственных испытаний
зав. лаб. микобактериальных препаратов



Д.Т.Леви

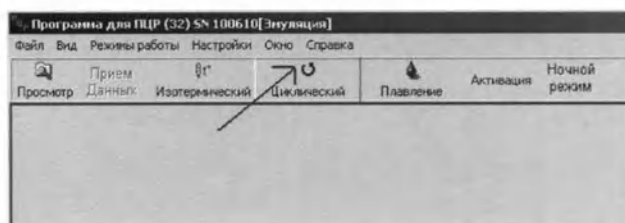
Порядок работы, учета и интерпретации результатов анализа на приборе АНК-32 (Россия)

Подготовка к работе

В случае первого использования прибора АНК-32 или переустановки программы необходимо создать **5 новых протоколов** – «Multi», «Риф –гроV531,516», «Риф –гроV526», «Риф –гроV533» и «Изониазид».

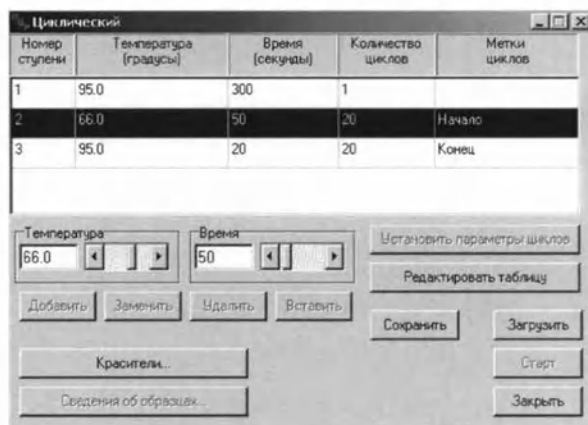
Создание протокола «Multi»

1. Открыть **программу «ПЦР»** для прибора АНК-32.
2. Выбрать Режим работы **Циклический**.

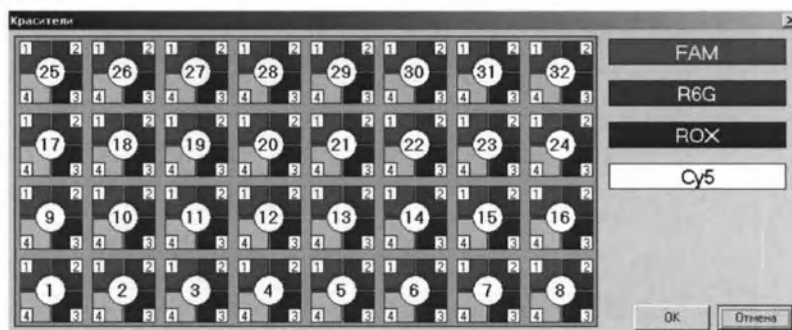


3. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору **здать программу** амплификатора со следующими параметрами:

Номер ступени	Температура	Время	Кол-во циклов	Метки циклов
1	95	300	1	
2	66	50	20	Начало
3	95	20	20	Конец



4. Нажать клавишу **«Красители»**, выбрать в появившемся окне красители **FAM, ROX и R6G** и нажать «ОК».



5. Нажать клавишу «Сведения об образцах...», в появившемся окне выбрать краситель FAM и, пользуясь инструкцией к прибору, ввести следующие сведения об образцах:

Лунка № 1: ПКО-multi

Лунка № 2: ОКО

Номер лунки	Тип	Название или номер
1	ПКО	ПКО-multi
2	ОКО	ОКО
3	ИО	1
4	ИО	2
5	ИО	3
6	ИО	
7	ИО	
8	ИО	
9	ИО	
10	ИО	
11	ИО	
12	ИО	
13	ИО	
14	ИО	
15	ИО	
16	ИО	

Нажать клавишу «ОК».

6. Нажать клавишу «Сохранить». В появившемся окне «Сохранить метод Циклический» нажать клавишу «Создать пользователя», ввести название папки «Анализ МБТ», и нажать «ОК»:

Если указанная папка уже существует, выбрать ее щелчком мыши.

Нажать клавишу «Сохранить», ввести название протокола «Multi» и нажать «ОК»:

7. При дальнейшей работе использовать созданный метод.

Создание протоколов «Риф-гpoB531,516», «Риф-гpoB526», «Риф-гpoB533»

1. Открыть **программу «ПЦР»** для прибора АНК-32.
2. Выбрать Режим работы **Циклический**.
3. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору **задать программу** амплификатора со следующими параметрами:

Номер ступени	Температура	Время	Кол-во циклов	Метки циклов
1	95	180	1	
2	58	50	40	Начало
3	95	20	40	Конец

4. Нажать клавишу **«Красители»**, выбрать в появившемся окне красители:

- **ROX, R6G/JOE и Cy5** – для комплектов № 2 (гpoB531), № 5 (гpoB516)

- **FAM, ROX, R6G/JOE и Cy5** – для комплектов № 3-4 (гpoB526)

- **ROX и Cy5** – для комплекта № 6 (гpoB533)

и нажать «ОК».

5. Нажать клавишу **«Сохранить»**. В появившемся окне «Сохранить метод Циклический» нажать клавишу «Создать пользователя», ввести название папки «Анализ МБТ», и нажать «ОК»:

Если указанная папка уже существует, выбрать ее щелчком мыши.

Нажать клавишу «Сохранить», ввести название протокола **«Риф-гpoB531,516»** (или **«Риф-гpoB526», «Риф-гpoB533»**) и нажать «ОК»:

6. При дальнейшей работе использовать созданные протоколы.

Создание протокола «Изониазид»

1. Открыть **программу «ПЦР»** для прибора АНК-32.

2. Выбрать Режим работы **Циклический**.

3. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору **задать программу** амплификатора со следующими параметрами:

Номер ступени	Температура	Время	Кол-во циклов	Метки циклов
1	95	180	1	
2	62	50	40	Начало
3	95	20	40	Конец

4. Нажать клавишу **«Красители»**, выбрать в появившемся окне красители **FAM, ROX, R6G/JOE и Cy5** и нажать «ОК».

5. Нажать клавишу **«Сохранить»**. В появившемся окне «Сохранить метод Циклический» нажать клавишу «Создать пользователя», ввести название папки «Анализ МБТ», и нажать «ОК»:

Если указанная папка уже существует, выбрать ее щелчком мыши.

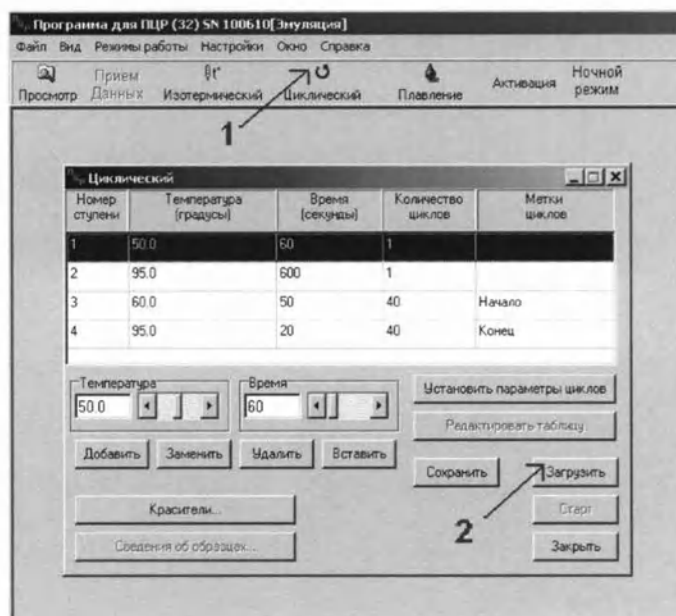
Нажать клавишу «Сохранить», ввести название протокола **«Изониазид»** и нажать «ОК»:

6. При дальнейшей работе использовать созданный метод.

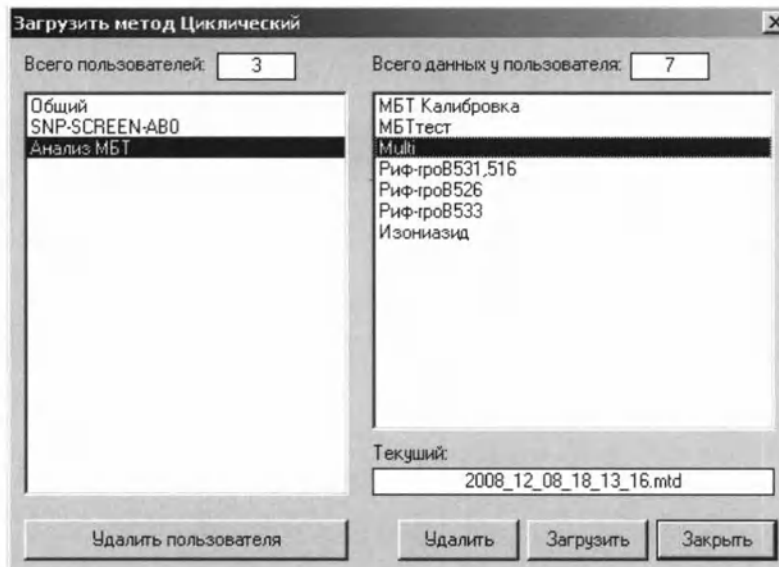
Проведение ПЦР-РВ

А. Мультиплексная ПЦР-РВ (Комплект № 1 «Multi»)

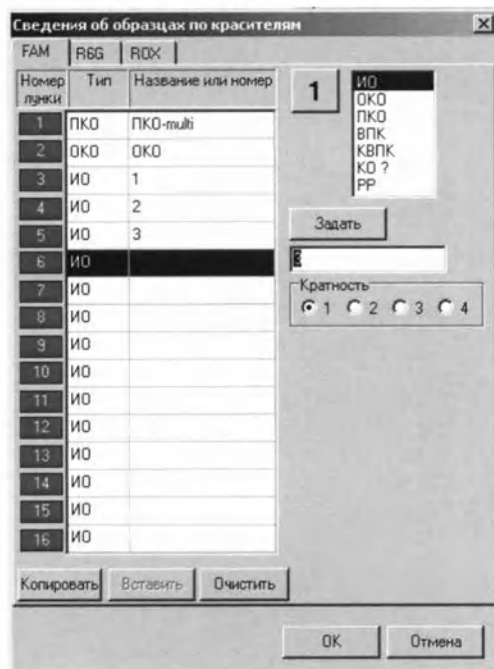
1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «ПЦР» для прибора АНК-32.
3. Выбрать режим работы «Циклический», нажать клавишу «Загрузить»



4. Выбрать папку «Анализ МБТ» и протокол «Multi» и нажать клавишу «Загрузить».

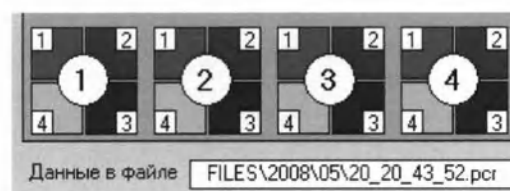


5. В появившемся окне «Красители» проверить установку красителей **FAM**, **ROX** и **R6Gi** нажать «ОК».
6. Начать работу прибора нажатием кнопки «Старт».
7. После загрузки и начала работы прибора в окне «Прием данных» нажать клавишу «Образцы». В появившемся окне выбрать краситель **FAM**, перейти на лунку № 3 и последовательно внести названия образцов.



Нажать клавишу «Копировать», перейти на краситель **ROX**, нажать клавишу «Вставить», перейти на краситель **R6G**, нажать клавишу «Вставить» и «ОК».

8. Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

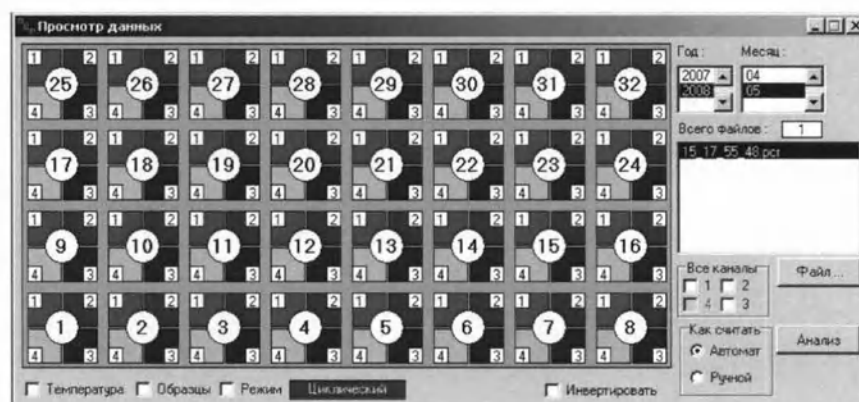


Окончание реакции

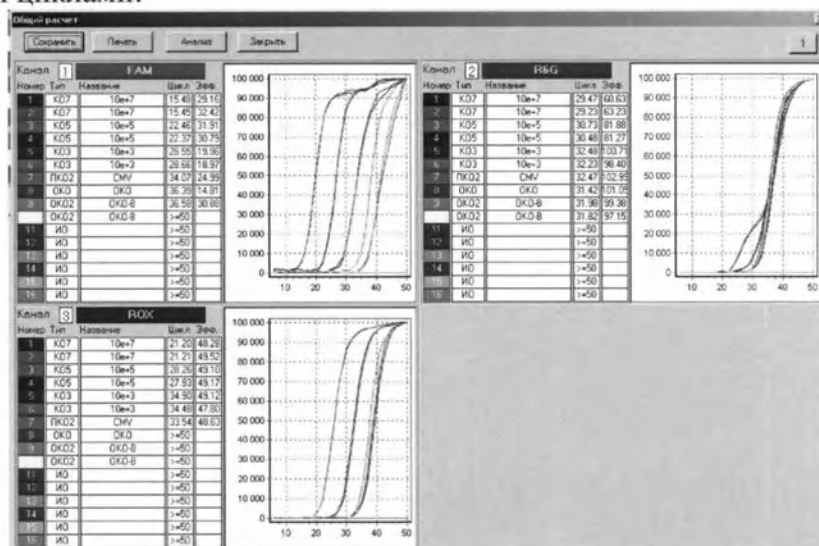
1. Отработанную пробирку с **ПКО-multi** после окончания реакции амплификации утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.
2. В пробирки с исследуемыми образцами после постановки мультиплексной ПЦР-РВ добавляют по **100** мкл «Буфера для разведения образцов» (комплект № 1). **Полученная смесь является исходной для дальнейшей постановки всех реакций ПЦР-РВ с помощью комплектов № 2 – 8!**

Расчет значений порогового цикла

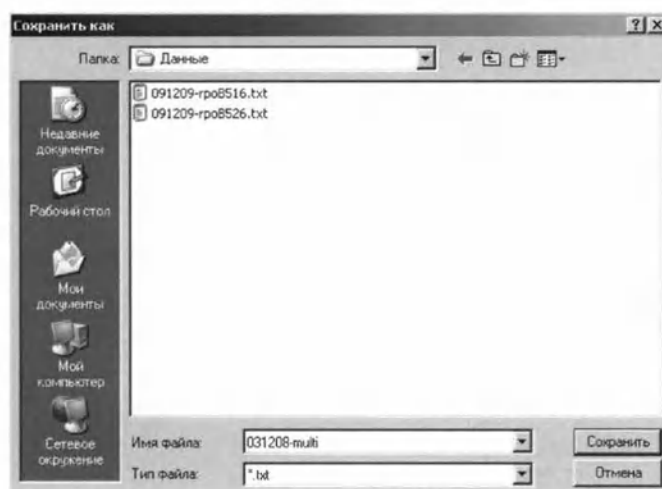
1. После завершения реакции, нажать клавишу «Просмотр».
2. Выбрать файл, содержащий данные работы прибора, щелчком левой кнопки мыши.



3. В меню «Как считать» выбрать «Автомат».
4. Нажать клавишу «Расчет». Появится окно «Общий расчет» с рассчитанными пороговыми циклами:



В этом окне нажать клавишу «Сохранить», выбрать «Рабочий стол» → «Анализ МБТ» → «МБТ-МЛУ» → «Данные» → «Год» → «Месяц», в поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число-multi». Нажать «Сохранить»:



Нажать клавишу «Заккрыть» в окне «Общий расчет».

5. Закрыть или свернуть программу «ПЦР».

Так как реакция «Multi» является промежуточной и служит только для накопления специфических фрагментов, результаты данной реакции не обрабатываются в программе Excel с помощью специального шаблона, а оцениваются по автоматическому расчету пороговых циклов в программе прибора. Реакция считается успешной, а результаты достоверными, если соблюдены все условия анализа для контрольных образцов.

Б. Определение устойчивости к рифампицину (комплекты № 2-6 «гpoB»)

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «ПЦР» для прибора АНК-32.
3. Выбрать режим работы «Циклический», нажать клавишу «Загрузить»

4. Выбрать папку «Анализ МБТ» и соответствующий протокол «Риф- грoB531,516» («Риф- грoB526», «Риф-грoB533») и нажать клавишу «Загрузить».
5. В появившемся окне «Красители» проверить установку красителей **FAM**, **ROX**, **R6G/JOE** и **Cy5** в соответствии с протоколом для каждого комплекта:
 - «Риф-грoB531,516» (комплекты № 2, 5) - **ROX**, **R6G/JOE** и **Cy5**;
 - «Риф-грoB526» (комплекты № 3, 4) - **FAM**, **ROX**, **R6G/JOE** и **Cy5**; - «Риф-грoB533» (комплекты № 6) - **ROX** и **Cy5**
 и нажать «ОК».
6. Начать работу прибора нажатием кнопки «Старт».
7. После загрузки и начала работы прибора в окне «Прием данных» нажать клавишу «Образцы». В появившемся окне выбрать краситель **FAM** (или **ROX**, **R6G/JOE**) и последовательно внести названия образцов в соответствии с таблицей следования образцов для каждого комплекта.

Номер лунки	Тип	Название или номер
1	ПК0	ПК0-гpo8
2	ПК0	ПК01-Alm3
3	ПК0	ПК02-Alm3
4	ПК0	ПК01-Alm4
5	ПК0	ПК02-Alm4
6	ПК0	ПК01-Alm5
7	ПК0	ПК02-Alm5
8	ОКО	ОКО
9	ИО	1
10	ИО	1
11	ИО	2
12	ИО	2
13	ИО	
14	ИО	
15	ИО	
16	ИО	

Нажать клавишу «Копировать», перейти на краситель **R6G**, нажать клавишу «Вставить», перейти на краситель **ROX**, перейти на краситель **Cy5**, нажать клавишу «Вставить» и «ОК».

8. Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

Расчет значений порогового цикла

1. После завершения реакции, нажать клавишу «Просмотр».
2. Проверить в «Настройки» → «Расчет» расчетные коэффициенты для соответствующего комплекта, прилагаемые на вкладыше к каждому комплекту.
3. Выбрать файл, содержащий данные работы прибора, щелчком левой кнопки мыши.
4. В меню «Как считать» выбрать «Автомат».
5. Нажать клавишу «Расчет». Появится окно «Общий расчет» с рассчитанными пороговыми циклами:

В этом окне нажать клавишу «Сохранить», выбрать «Рабочий стол» → «Анализ МБТ» → «МБТ-МЛУ» → «Данные» → «Год» → «Месяц», в поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число-грoB526». Нажать «Сохранить».

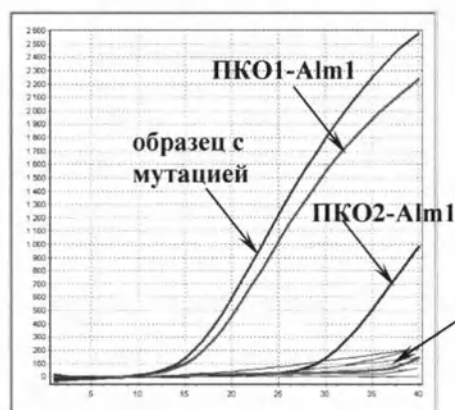
Нажать клавишу «Закрыть» в окне «Общий расчет».

6. Закрыть или свернуть программу «ПЦР».

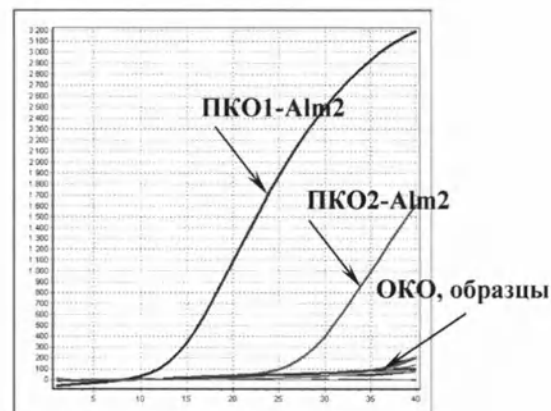
Примеры кинетических кривых

Пример кинетических кривых определения устойчивости к рифампицину (ген *groB* 531 кодон).

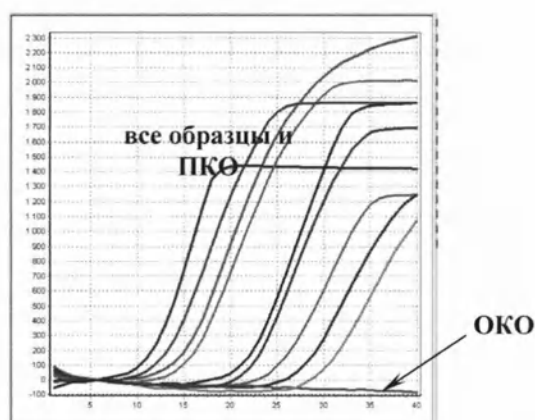
канал **JOE** (мутация Alm1 – Ser-Leu)



канал **ROX** (мутация Alm2 – Ser-Trp)

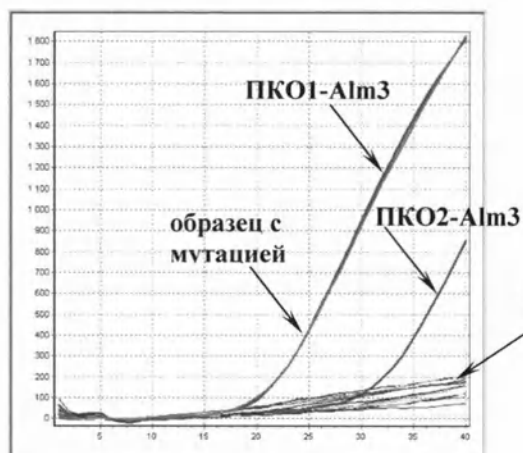


канал **Sy5** (зонд)



Пример кинетических кривых определения устойчивости к рифампицину (ген *groB* 526 кодон).

канал **FAM** (мутация Alm3 – His-Tyr)

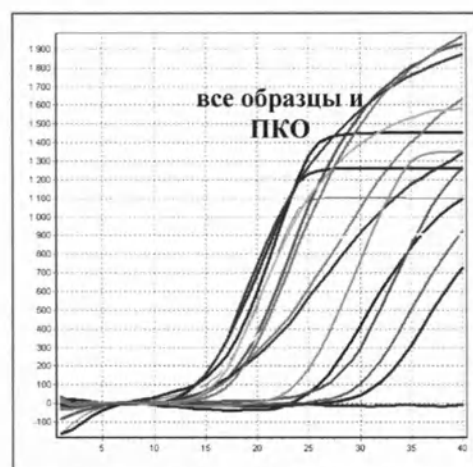
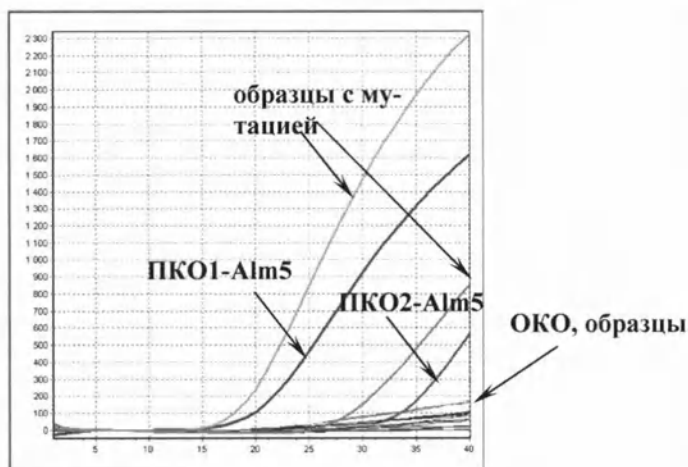


канал **JOE** (мутация Alm4 – His-Asp)



канал **ROX** (мутация Alm5 – His-Arg)

канал **Cy5** (зонд)



В. Определение устойчивости к изониазиду (комплекты № 7-8 «katG», «inh»)

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «ПЦР» для прибора АНК-32.
3. Выбрать режим работы «Циклический», нажать клавишу «Загрузить»
4. Выбрать папку «Анализ МБТ», протокол «Изониазид» и нажать клавишу «Загрузить».
5. В появившемся окне «Красители» проверить установку красителей **FAM**, **ROX**, **R6G/JOE** и **Cy5**.
6. Начать работу прибора нажатием кнопки «Старт».
7. После загрузки и начала работы прибора в окне «Прием данных» нажать клавишу «Образцы». В появившемся окне выбрать краситель **FAM** и последовательно внести названия образцов в соответствии с таблицей следования образцов для каждого комплекта.

Номер лунки	Тип	Название или номер
1	ПКО	ПКО-katG
2	ПКО	ПКО1-Alm12
3	ПКО	ПКО2-Alm12
4	ПКО	ПКО1-Alm13
5	ПКО	ПКО2-Alm13
6	ПКО	ПКО1-Alm14
7	ПКО	ПКО2-Alm14
8	ОКО	ОКО
9	ИО2	1
10	ИО2	1
11	ИО2	2
12	ИО2	2
13	ИО	
14	ИО	
15	ИО	
16	ИО	

- Нажать клавишу «Копировать», перейти на краситель **R6G**, нажать клавишу «Вставить», перейти на краситель **ROX**, перейти на краситель **Cy5**, нажать клавишу «Вставить» и «ОК».
8. Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

Расчет значений порогового цикла

1. После завершения реакции, нажать клавишу «Просмотр».
2. Проверить в «Настройки» → «Расчет» расчетные коэффициенты для соответствующего комплекта, прилагаемые на вкладыше к каждому комплекту.
3. Выбрать файл, содержащий данные работы прибора, щелчком левой кнопки мыши.
4. В меню «Как считать» выбрать «Автомат».
5. Нажать клавишу «Расчет». Появится окно «Общий расчет» с рассчитанными пороговыми циклами.

В этом окне нажать клавишу «Сохранить», выбрать «Рабочий стол» → «Анализ МБТ» → «МБТ-МЛУ» → «Данные» → «Год» → «Месяц», в поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число-katG». Нажать «Сохранить».

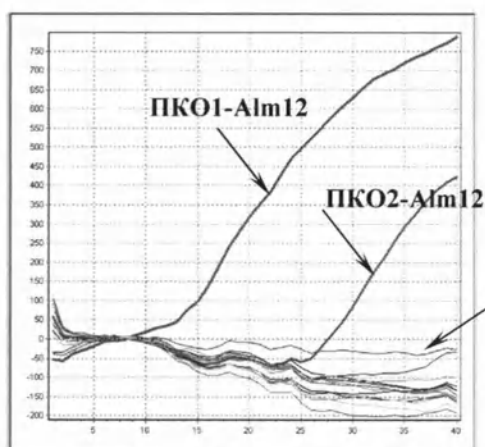
Нажать клавишу «Закрыть» в окне «Общий расчет».

6. Закрыть или свернуть программу «ПЦР».

Примеры кинетических кривых

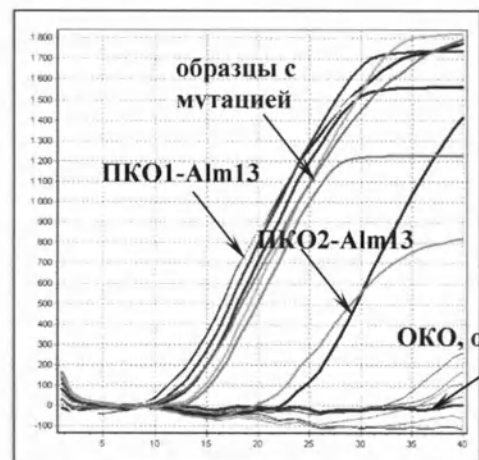
Пример кинетических кривых определения устойчивости к изониазиду (ген *katG* 315 кодон).

канал **FAM** (мутация Alm12 – Ser-Thr2)



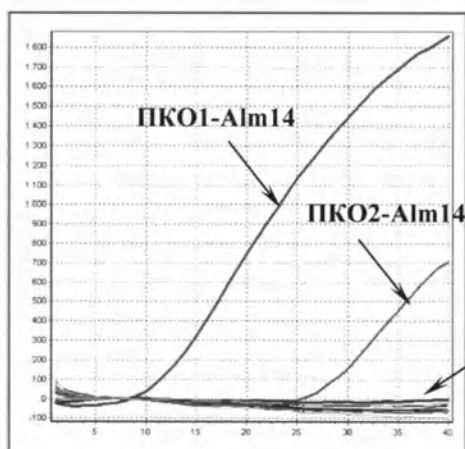
ОКО, образцы

канал **JOE** (мутация Alm13 – Ser-Thr1)



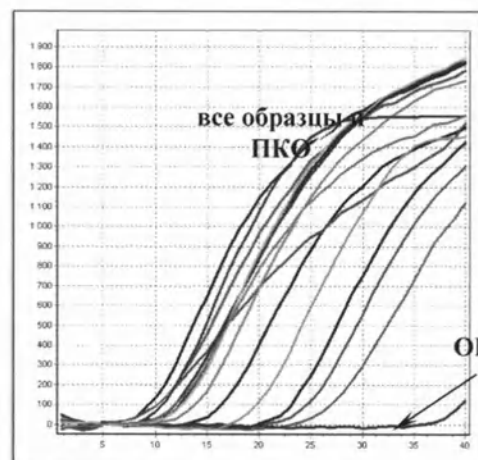
ОКО, образцы

канал **ROX** (мутация Alm14 – Ser-Asn)



ОКО, образцы

канал **Cy5** (зонд)



ОКО

Организация отчетных файлов

Рекомендуется следующая организация отчетных файлов на компьютере:

1. Создать на Рабочем столе (или другом удобном месте) папку «МБТ».
2. Внутри папки «МБТ» создать 2 папки с названиями «Шаблоны» и «Отчеты».
3. В папку «Шаблон» скопировать шаблон для обработки результатов анализа с CD-диска, который прилагается к набору реагентов.
4. Внутри папки «Отчеты» создать папки по годам и, если требуется, по месяцам.

Настройка параметров программы «Excel»

Для обработки результатов реакции необходимо, чтобы на компьютере была установлена программа Microsoft Excel из пакета Microsoft Office.

Для корректной работы шаблона для автоматической обработки результатов необходимо, чтобы в программе Excel в качестве разделителя целой и дробной части была установлена запятая. Данная операция выполняется один раз. Если Вы уже выполняли эту операцию для этой или других тест-систем, этот пункт следует пропустить.

Открыть программу Excel.

Нажать: Пуск → Программы → Microsoft Office Excel

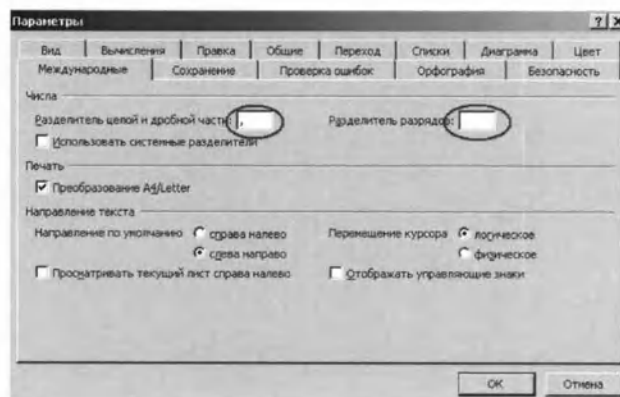
В программе Excel выбрать вкладку «Сервис», затем «Параметры»:



Выбрать закладку «Международные» и в разделе «Числа» указать:

Разделитель целой и дробной части « , »

Разделитель разрядов – пробел:



Нажать клавишу «ОК».

Обработка результатов в программе Excel

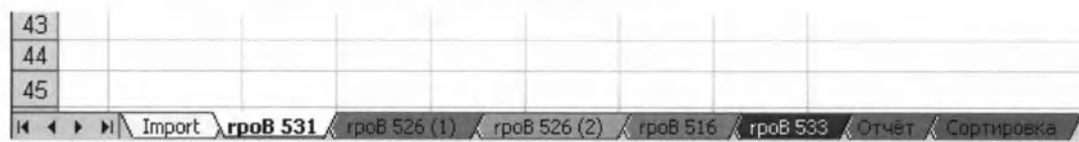
Результаты анализа исследуемых образцов принимаются только при выполнении ВСЕХ вышеперечисленных условий для контрольных образцов (см. п.8 основной инструкции).

А. Мультиплексная ПЦР-РВ (Комплект № 1 «Multi»)

Так как реакция «Multi» является промежуточной и служит только для накопления специфических фрагментов, результаты данной реакции не обрабатываются в программе Excel с помощью специального шаблона, а оцениваются по автоматическому расчету пороговых циклов в программе прибора. Реакция считается успешной, а результаты достоверными, если соблюдены все условия анализа для контрольных образцов.

Б. Определение устойчивости к рифампицину (комплекты № 2-6 «groB»)

1. Открыть шаблон «Рифампицин». Для этого выбрать **Рабочий стол** → **МБТ** → **Шаблоны** → **Рифампицин.xlt**. Нажать «Не отключать макросы».
2. Шаблон состоит из нескольких листов. Названия листов соответствуют определенным комплектам (groB531 - № 2, groB526(1) - № 3, groB526(2) - № 4, groB516- № 5, groB533 - № 6). На листе «Отчет» автоматически собираются все данные из листов по каждому комплекту. Лист «Сортировка» служит для окончательной сортировки всех исследуемых образцов, содержащихся в шаблоне. Чтобы обработать результаты определенной постановки, необходимо открыть в шаблоне соответствующий лист (groB531, groB526(1), groB526(2), groB516, groB533).



3. Ввести в соответствующие ячейки дату, имя оператора, название исходного файла (в программе «ПЦР»), серийный номер набора.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Тест-система:	"АмплиТуб-МЛУ-РВ" groB ген 531 кодон						
2	Тип анализа:	качественный						
3	Дата:	09.12.2008						
4	Оператор:	Пашко						
5	Файл:	09_14_29_56						
6	Серия	050608-01						

4. Импортировать в шаблон рассчитанные значения пороговых циклов. Для этого нажать клавишу «Импорт данных», выбрать папку **Рабочий стол** → **МБТ** → **Данные** → **Год** → **Месяц** → «название_файла». Нажать «Открыть» и «Готово».
- В столбце «Название» отражены названия контрольных и исследуемых образцов ;
 - В столбце «Зонд/МБТ» отражены пороговые циклы по каналу **Sy5** и результаты по обнаружению микобактерий туберкулезного комплекса в контрольных и исследуемых образцах;

- В столбцах «**Alm**» отражены пороговые циклы по соответствующему каналу и результаты по обнаружению мутаций в контрольных и исследуемых образцах;
- в столбце «**Выводы**» представлены результаты автоматического анализа контрольных и исследуемых образцов;
- в столбце «**Действие**» представлены результаты автоматического анализа возможных действий.

5. Сохранить отчет. Для этого нажать «Файл», затем «Сохранить как...». Выбрать **Рабочий стол** → **МБТ** → **Отчеты** → **Год** → **Месяц**. В поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число.**отчет**». Нажать «Сохранить». При желании лист можно распечатать.

6. При последующей обработке постановок другими комплектами необходимо выбрать соответствующий лист в сохраненном отчетном файле «год.месяц.число.**отчет**» и повторить пп.3-5.

7. После импорта данных во все листы комплекта (или в несколько, или даже в один) можно провести сортировку исследуемых образцов на листе «**Сортировка**». Все исследуемые образцы, содержащиеся в данном шаблоне, будут отсортированы по названию с указанием результатов анализа по каждому комплекту. Если для данного образца постановка комплектом не проводилась, то в соответствующей ячейке будет пусто. При распечатке этого листа рекомендуется выделять область печати.

Пример файла с импортированными данными и результатами анализа.

Тест-система:		"АмплиТуб-МЛУ-РВ" groV ген 526 кодон									
Тип анализа:		качественный									
Дата:		29.10.2008									
Оператор:		Аляпкина									
Файл:		29_21_47_37									
Серия		001									
№	Название	Alm3		Alm5		Alm4		Зонд/МБТ		Вывод	Действие
		Ct FAM	обнаруж.	Ct ROX	обнаруж.	Ct JOE	обнаруж.	Ct Cy5	обнаруж.		
1	ПКО-groV		-		-		-	28,09	+	Результаты постановки по ПКО достоверны	Анализ завершен
2	ПКО1-Alm3	19,31	+		-		-	16,41	+	Результаты постановки по ПКО1-Alm3 достоверны	Анализ завершен
3	ПКО2-Alm3	30,67	+		-		-	26,32	+	Результаты постановки по ПКО2-Alm3 достоверны	Анализ завершен
4	ПКО1-Alm4		-		-	17,09	+	15,17	+	Результаты постановки по ПКО1-Alm4 достоверны	Анализ завершен
5	ПКО2-Alm4		-		-	31,58	+	30,48	+	Результаты постановки по ПКО2-Alm4 достоверны	Анализ завершен
6	ПКО1-Alm5		-	17,28	+		-	15,11	+	Результаты постановки по ПКО1-Alm5 достоверны	Анализ завершен
7	ПКО2-Alm5		-	32,25	-		-	29,9	+	Результаты постановки по ПКО2-Alm5 недостоверны	Сменить реактивы, повторить постановку
8	ОКО		-		-		-		-	Результаты постановки по ОКО достоверны	Анализ завершен
9	7		-	26,97	+		-	23,7	+	Мутация пров теста НК-Arg в 526 кодоне. Устойчив к крифаминцилу.	Анализ завершен
10	8		-		-		-	12,97	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
11	118	29,55	+		-		-	28,02	+	Мутация пров теста НК-Tyr в 526 кодоне. Устойчив к крифаминцилу.	Анализ завершен
12	131		-		-		-	23,51	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
13	1811		-	32,37	-		-	29,66	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
14	5393		-		-		-	26,69	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
15	7327		-		-		-	22,85	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
16	19255		-		-	23,30	+	21,16	+	Мутация пров теста НК-Asp в 526 кодоне. Устойчив к крифаминцилу.	Анализ завершен
17	30693		-		-		-	16,51	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
18	42599		-	23,52	+		-	22,13	+	Мутация пров теста НК-Arg в 526 кодоне. Устойчив к крифаминцилу.	Анализ завершен
19	45010		-	19,89	+		-	18,35	+	Мутация пров теста НК-Arg в 526 кодоне. Устойчив к крифаминцилу.	Анализ завершен
20	46302	29,38	+		-		-	27,39	+	Мутация пров теста НК-Tyr в 526 кодоне. Устойчив к крифаминцилу.	Анализ завершен
21			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.

Тест-система:		"АмплиТуб-МЛУ-РВ" гров ген 531 кодон							
Тип анализа:		качественный							
Дата:		28.10.2008							
Оператор:		Аляпкина							
Файл:		28_20_09_12							
Серия		001							
№	Название	Alm2		Alm1		Зонд/МБТ		Вывод	Действие
		Ct ROX	обнаруж.	Ct JOE	обнаруж.	Ct Су5	обнаруж.		
1	ПКО-гров		-		-	20,32	+	Результаты постановки по ПКО достоверны	Анализ завершен
2	ПКО1-Alm1		-	14,28	+	12,91	+	Результаты постановки по ПКО1-Alm1 достоверны	Анализ завершен
3	ПКО2-Alm1		-	26,02	+	24,59	+	Результаты постановки по ПКО2-Alm1 достоверны	Анализ завершен
4	ПКО1-Alm2	10,33	+		-	9,49	+	Результаты постановки по ПКО1-Alm2 достоверны	Анализ завершен
5	ПКО2-Alm2	23	+		-	21,55	+	Результаты постановки по ПКО2-Alm2 достоверны	Анализ завершен
6	ОКО		-		-		-	Результаты постановки по ОКО достоверны	Анализ завершен
7	7		-		-	28,21	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
8	8		-	24,55	+	22,87	+	Мутация гров гена Ser-Leu в 531 кодоне. Устойчив к рифампицину.	Анализ завершен
9	118		-		-	17,97	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
10	131		-		-	17,43	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
11	1811		-		-	14,53	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
12	5393		-	20,74	+	19,36	+	Мутация гров гена Ser-Leu в 531 кодоне. Устойчив к рифампицину.	Анализ завершен
13	7327		-		-	16,36	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
14	19255		-		-	13,89	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
15	30693		-		-	18,68	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
16	42599		-		-	21,68	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
17	45010		-		-	15,05	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
18	46302		-		-	17,24	+	Мутация не найдено.	Продолжить анализ на устойчивость.
19			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
20			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
21			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
22			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
23			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
24			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
25			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
26			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
27			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.
28			-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить постановку.

Итоговая таблица определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину

Дата
Оператор

01.11.2008
Аляпкина (Синтол)

Сортировка

Образцы	гров 531 кодон	гров 526(1) кодон	гров 526(2) кодон	гров 516 кодон	гров 533 кодон
7	Мутация не зафиксирована.				
7		Мутация гена <i>rif^R</i> в 526 кодоне. Устойчив к рифампицину.			
7			Мутация не зафиксирована.		
7				Мутация гена <i>rif^R</i> в 516 кодоне. Устойчив к рифампицину.	
7					Мутация не зафиксирована.
8	Мутация гена <i>rif^R</i> в 531 кодоне. Устойчив к рифампицину.				
8		Мутация не зафиксирована.			
8			Мутация не зафиксирована.		
8				Мутация не зафиксирована.	
8					Мутация не зафиксирована.
118	Мутация не зафиксирована.				
118		Мутация гена <i>rif^R</i> в 526 кодоне. Устойчив к рифампицину.			
118			Мутация не зафиксирована.		
118				Мутация не зафиксирована.	
118					Мутация не зафиксирована.
131	Мутация не зафиксирована.				
131		Мутация не зафиксирована.			
131			Мутация не зафиксирована.		
131				Мутация гена <i>rif^R</i> в 516 кодоне. Устойчив к рифампицину.	
131					Мутация не зафиксирована.
1811	Мутация не зафиксирована.				
1811		Мутация не зафиксирована.			
1811			Мутация гена <i>rif^R</i> в 526 кодоне. Устойчив к рифампицину.		
1811				Мутация не зафиксирована.	

В. Определение устойчивости к изониазиду (комплекты № 7-8 «katG», «inh»)

1. Открыть шаблон «Изониазид». Для этого выбрать **Рабочий стол → МБТ → Шаблоны → Изониазид.xlt**. Нажать «Не отключать макросы».

2. Шаблон состоит из нескольких листов. Названия листов соответствуют определенным комплектам (katG - № 7, inhA - № 8). На листе «Отчет» автоматически собираются все данные из листов по каждому комплекту. Лист «Сортировка» служит для окончательной сортировки всех исследуемых образцов, содержащихся в шаблоне. Чтобы обработать результаты определенной постановки, необходимо открыть в шаблоне соответствующий лист (katG, inhA).

3. Ввести в соответствующие ячейки дату, имя оператора, название исходного файла (в программе «ПЦР»), серийный номер набора.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Тест-система:	"АмплиТуб-МПУ-РВ" katG ген 315 кодон						
2	Тип анализа:	качественный						
3	Дата:	28.10.2008						
4	Оператор:	Аляпкина						
5	Файл:	28_19_59_54						
6	Серия	001						

4. Импортировать в шаблон рассчитанные значения пороговых циклов. Для этого нажать клавишу «Импорт данных», выбрать папку **Рабочий стол → МБТ → Данные → Год → Месяц → «название_файла»**. Нажать «Открыть» и «Готово».

- В столбце «Название» отражены названия контрольных и исследуемых образцов;
- В столбце «Зонд/МБТ» отражены пороговые циклы по каналу **Cy5** (для набора № 7) или **R6G** (для набора № 8) и результаты по обнаружению микобактерий туберкулезного комплекса в контрольных и исследуемых образцах;
- В столбцах «Aim» отражены пороговые циклы по соответствующему каналу и результаты по обнаружению мутаций в контрольных и исследуемых образцах;
- в столбце «Выводы» представлены результаты автоматического анализа контрольных и исследуемых образцов;
- в столбце «Действие» представлены результаты автоматического анализа возможных действий

5. Сохранить отчет. Для этого нажать «Файл», затем «Сохранить как...». Выбрать **Рабочий стол → МБТ → Отчеты → Год → Месяц**. В поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число.отчет». Нажать «Сохранить». При желании лист можно распечатать.

6. При последующей обработке постановок другим комплектом необходимо выбрать соответствующий лист в сохраненном отчетном файле «год.месяц.число.отчет» и повторить пп.3-5.

7. После импорта данных во все листы комплекта (или в несколько, или даже в один) можно провести сортировку исследуемых образцов на листе «Сортировка». Все исследуемые образцы, содержащиеся в данном шаблоне, будут отсортированы по названию с указанием результатов анализа по каждому комплекту. Если для данного образца постановка комплектом не проводилась, то в соответствующей ячейке будет пусто. При распечатке этого листа рекомендуется выделять область печати.

Пример файла с импортированными данными и результатами анализа.

Тест-система:		"АмплиТуб-МПУ-РВ" katG ген 315 кодон									
Тип анализа:		качественный									
Дата:		28.10.2008									
Оператор:		Аляпкина									
Файл:		28_19_59_54									
Серия		001									
		Импорт данных									
№	Название	Alm12		Alm14		Alm13		Зонд/МБТ		Вывод	Действие
		Ct FAM	обнаруж.	Ct ROX	обнаруж.	Ct JOE	обнаруж.	Ct Cy5	обнаруж.		
1	ПКО-katG		-		-		-	14,58	+	Результаты востановки по ПКО достоверны	Анализ завершен
2	ПКО1-Alm12	11,37	+		-		-	9,13	+	Результаты востановки по ПКО1-Alm12 достоверны	Анализ завершен
3	ПКО2-Alm12	26,34	+		-		-	23,3	+	Результаты востановки по ПКО2-Alm12 достоверны	Анализ завершен
4	ПКО1-Alm13		-		-	10,14	+	8,04	+	Результаты востановки по ПКО1-Alm13 достоверны	Анализ завершен
5	ПКО2-Alm13		-		-	23,23	+	21,41	+	Результаты востановки по ПКО2-Alm13 достоверны	Анализ завершен
6	ПКО1-Alm14		-	9	+		-	7,07	+	Результаты востановки по ПКО1-Alm14 достоверны	Анализ завершен
7	ПКО2-Alm14		-	26,19	+		-	25,57	+	Результаты востановки по ПКО2-Alm14 достоверны	Анализ завершен
8	ОКО		-		-		-		-	Результаты востановки по ОКО достоверны	Анализ завершен
9	336		-		-	14,02	+	12,43	+	Мутация katG гена Ser-T1r1 в 315 кодоне. Устойчиво к изолязиду.	Анализ завершен
10	337		-		-	10,62	+	8,77	+	Мутация katG гена Ser-T1r1 в 315 кодоне. Устойчиво к изолязиду.	Анализ завершен
11	341		-		-		-	10,06	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
12	385		-		-	12,31	+	11,07	+	Мутация katG гена Ser-T1r1 в 315 кодоне. Устойчиво к изолязиду.	Анализ завершен
13	7		-		-	19,84	+	18,36	+	Мутация katG гена Ser-T1r1 в 315 кодоне. Устойчиво к изолязиду.	Анализ завершен
14	19255		-		-	11,42	+	9,68	+	Мутация katG гена Ser-T1r1 в 315 кодоне. Устойчиво к изолязиду.	Анализ завершен
15	42599		-		-	13,37	+	11,52	+	Мутация katG гена Ser-T1r1 в 315 кодоне. Устойчиво к изолязиду.	Анализ завершен
16	46330		-		-	11,84	+	10,44	+	Мутация katG гена Ser-T1r1 в 315 кодоне. Устойчиво к изолязиду.	Анализ завершен
17			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.
18			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.
19			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.
20			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.
21			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.
22			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.
23			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.
24			-		-		-		-	МБТ не обнаружены.	Проверить начальное количество образца. Возможно ингибирование. Повторить востановку.

Тест-система:		"АмплиТуб-МЛУ-РВ" inhA ген C209T замена					
Тип анализа:		качественный					
Дата:		09.12.2008			Импорт данных		
Оператор:		Аляпкина					
Файл:		09_20_15					
Серия		001					
№	Название	Alm15		Зонд/МБТ		Вывод	Действие
		Ct FAM	обнаруж.	Ct R6G	обнаруж.		
1	ПКО-inhA		-	11,35	+	Результаты вставки по ПКО достоверны	Анализ завершен
2	ПКО1-Alm15	13,05	+	11,46	+	Результаты вставки по ПКО1-Alm15 достоверны	Анализ завершен
3	ПКО2-Alm15	24,07	+	22,32	+	Результаты вставки по ПКО2-Alm15 достоверны	Анализ завершен
4	ОКО		-		-	Результаты вставки по ОКО достоверны	Анализ завершен
5	336		-	10,55	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
6	337		-	7,67	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
7	341	10,79	+	9,74	+	Мутация inhA C209T. Устойчиве к колизиду.	Анализ завершен
8	385	9,93	+	9,24	+	Мутация inhA C209T. Устойчиве к колизиду.	Анализ завершен
9	7	19,64	+	17,18	+	Мутация inhA C209T. Устойчиве к колизиду.	Анализ завершен
10	19255		-	7,41	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
11	42599		-	9,48	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
12	46330		-	8,46	+	Мутация не найдена.	Продолжить анализ на устойчивость.
13			-				
14			-				
15			-				
16			-				

Итоговая таблица определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду

	Дата Оператор	10 декабря 2008 г. Аляпкина	Сортировка
Образцы	inhA C209T	katG 315 кодон	
7	Мутация inhA C209T. Устойчив к изониазиду.		
7		Мутация katG реза Ser-T191 в 315 кодоне. Устойчив к изониазиду.	
336	Мутация не найдено.		
336		Мутация katG реза Ser-T191 в 315 кодоне. Устойчив к изониазиду.	
337	Мутация не найдено.		
337		Мутация katG реза Ser-T191 в 315 кодоне. Устойчив к изониазиду.	
341	Мутация inhA C209T. Устойчив к изониазиду.		
341		Мутация не найдено.	
385	Мутация inhA C209T. Устойчив к изониазиду.		
385		Мутация katG реза Ser-T191 в 315 кодоне. Устойчив к изониазиду.	
19255	Мутация не найдено.		
19255		Мутация katG реза Ser-T191 в 315 кодоне. Устойчив к изониазиду.	
42599	Мутация не найдено.		
42599		Мутация katG реза Ser-T191 в 315 кодоне. Устойчив к изониазиду.	
46330	Мутация не найдено.		
46330		Мутация katG реза Ser-T191 в 315 кодоне. Устойчив к изониазиду.	

Всего проинформировано,
проинформировано и
свершено печатью
47 (сорок семь)
листов.



ГЕНЕРАЛЬНЫЙ
ДИРЕКТОР
КУЗУБОВ А. В.