

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

«22» 04 2009 г.

№ 01-11/42-09

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Амплитуб-РВ»,
набора реагентов для выделения, обнаружения и количественного
определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом
полимеразной цепной реакции в реальном времени

Москва 2008

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича
Роспотребнадзора

Н.В.Медунидын

«03» 09 2009 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиТуб-РВ» предназначен для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в культуре микобактерий и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). *Описание используемого метода ПЦР-РВ и реакций, используемых в данном наборе, см. приложение 1.*

1.2. Область применения набора – клиническая медицина (лабораторная диагностика). Набор реагентов «АмплиТуб-РВ» может быть использован в клинической диагностике, а также для оценки эффективности терапии.

2. СОСТАВ

Набор состоит из комплекта реагентов для выделения ДНК (комплект № 1) и комплекта реагентов для проведения количественного ПЦР-РВ анализа (комплект № 2).

2.1. Комплект для выделения ДНК (комплект № 1)

Комплект рассчитан на 50 определений.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Внутренний положительный контроль ВПК-В Туб	прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл	2 пробирки
2.	Лизирующий раствор 1, G1 Туб	прозрачная бесцветная жидкость	30 мл	1 флакон
3.	Сорбирующий раствор, СР-ФС Туб	суспензия с осадком темно-коричневого цвета	0,06 мл	50 пробирок
4.	Осаждающий раствор, ОР Туб	прозрачная бесцветная жидкость	30 мл	1 флакон
5.	Лизирующий раствор 3, G3 Туб	прозрачная бесцветная жидкость	30 мл	1 флакон
6.	Промывочный раствор А, ПР-А	прозрачная бесцветная жидкость	30 мл	1 флакон
7.	Промывочный раствор В, ПР-В	прозрачная бесцветная жидкость	30 мл	1 флакон
8.	Промывочный раствор С, ПР-С	прозрачная бесцветная жидкость	30 мл	1 флакон

2.2. Комплект для проведения количественного ПЦР-РВ анализа (комплект № 2)

Комплект рассчитан на проведение 100 реакций.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь, РС ОМ АмплиТуб-РВ	прозрачная бесцветная жидкость	0,025 мл	100 пробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-Туб	прозрачная бесцветная жидкость	0,2 мл	1 пробирка
3.	Калибровочный образец, КО3-Туб	прозрачная бесцветная жидкость	0,2 мл	1 пробирка
4.	Калибровочный образец, КО5-Туб	прозрачная бесцветная жидкость	0,2 мл	1 пробирка
5.	Калибровочный образец, КО7-Туб	прозрачная бесцветная жидкость	0,2 мл	1 пробирка
6.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,2 мл	1 пробирка

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1 Специфичность анализа – 100%. Набор реагентов выявляет только ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* (МБТ). В образцах, содержащих ДНК *M. tuberculosis complex*, определяется количество клеток МБТ в образце. В образцах, не содержащих ДНК *M. tuberculosis complex*, результат исследования должен быть отрицательным.

3.2. Чувствительность – не более 5×10^2 клеток/мл.

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-

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 (например, 0,2% 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

5.1. Для выделения ДНК из культуры и клинического материала требуется:

- настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф;
- твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25-100 °С;

- микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс;
- набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл;
- одноразовые медицинские перчатки;
- штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 мл;
- емкость с дезинфицирующим средством;
- холодильник на 2-8 °С и на минус 20 °С.

5.2. 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. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследований служат: мокрота (пробы со слизью), промывные воды бронхов, спинномозговая жидкость, экссудат, пунктат,

биоптат, моча, отделяемое половых путей, секционный материал, культура микобактерий.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ с помощью набора реагентов методом ПЦР-РВ состоит из трех этапов:

- выделение ДНК;
- проведение ПЦР-РВ;
- учет результатов анализа.

7.1. Выделение ДНК

Для выделения ДНК используют комплект № 1.

7.1.1. Предварительная обработка материала

Предварительная обработка клинического материала проводится в соответствии со стандартными процедурами пробоподготовки при микробиологических исследованиях (Приказ № 109 Минздрава РФ 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации», приложение 11 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза»).

Мокрота

Образцы мокроты собирают в одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 50 мл с завинчивающимися крышками. Мокроту гомогенизируют в тех же пробирках, добавляя равный объем 4% раствора натрия гидроксида и, при необходимости, N-ацетил-L-цистеин из расчета 50–70 мг сухого вещества на 1 образец. Затем образцы интенсивно перемешивают на встряхивателе или

гомогенизируют при перемешивании с помощью шейкера (ротамикс) в зависимости от консистенции образца в течение 5-20 мин. Затем гомогенизированные образцы центрифугируют при 3000 об/мин (2800 – 3000 g) в течение 15 мин. Супернатант сливают в дезинфицирующий раствор. Полученный осадок ресуспендируют и переносят в микропробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5-10 мин. при 12 000 об/мин. Супернатант удаляют. Полученный осадок используют в качестве образца для выделения ДНК.

Биоптат

Биоптат гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 50% суспензию на стерильном 0,9% растворе натрия хлорида или фосфатном буфере (PBS, Sigma, США). Переносят 200 мкл в микропробирку на 1,5 мл. Полученную аликвоту используют в качестве образца для выделения ДНК.

Промывные воды бронхов, спинномозговая жидкость, экссудат, пунктат, моча, отделяемое половых путей.

Промывные воды бронхов, спинномозговую жидкость, экссудат, пунктат, или отделяемое половых путей переносят в микропробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин. при 12 000 об/мин. Супернатант удаляют. Мочу центрифугируют, используя метод накопления осадка. Полученный осадок используют в качестве образца для выделения ДНК.

Культура клеток

Исследуемую суспензию клеток переносят в микропробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин. при 12 000 об/мин. Супернатант удаляют. Полученный осадок используют в качестве образца для выделения ДНК.

7.1.2. Протокол выделения ДНК из образцов комплектом №1.

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (**ОКО-В**), который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе выделения ДНК.

1. В пробирки с исследуемым материалом и **ОКО-В** вносят 500 мкл лизирующего раствора **1, G1 Туб** (в качестве отрицательного контроля можно использовать 200 мкл воды или ТЕ буфера).
2. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на микроцентрифуге-вортексе и инкубируют при 65 °С в течение 10 мин.
3. Отбирают необходимое количество пробирок с сорбирующим раствором, **СР-ФС Туб**, и маркируют их.
4. Перемешивают содержимое пробирки с **ВПК-В Туб** на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируют 15 с при 4000 об/мин.
5. Переносят 500 мкл лизированной смеси в пробирки с сорбирующим раствором, **СР-ФС Туб**, в соответствии с маркировкой. Вносят в каждую пробирку 20 мкл раствора **ВПК-В Туб**, затем 500 мкл осаждающего раствора, **ОР Туб**.
6. Тщательно перемешивают содержимое пробирок до равномерного распределения сорбента, выдерживают 5 мин. при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-вортексе. Центрифугируют в течение 5 мин. при 13000 об/мин.
7. Помещают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.

8. Вносят в пробирки с осадком по 500 мкл лизирующего раствора 3, **G3 Туб**, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента и центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.
9. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора А, **ПР-А**, перемешивают содержимое пробирки на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента, центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.
10. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора В, **ПР-В** , перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента, центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.
11. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора С, **ПР-С**, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента, центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.
12. Выдерживают пробирки с открытыми крышками в течение 5 мин. при температуре 65 °С для удаления остатков промывочного раствора С, **ПР-С**.
13. Добавляют в пробирки по 100 мкл элюирующего раствора, **ЭР**, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента.
14. Выдерживают пробирки в течение 10 мин. при температуре 65 °С, периодически перемешивая на микроцентрифуге-вортексе. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 13000 об/мин и устанавливают в магнитный штатив на 1 мин.

15. Переносят из пробирок водную фазу, содержащую ДНК, в чистые, предварительно промаркированные, 1,5 мл пробирки.

Водная фаза содержит ДНК. Раствор ДНК до проведения анализа в течение суток рекомендуется хранить при температуре 4°C, при более длительных сроках – при минус 20°C.

7.2. Постановка ПЦР-РВ комплектом № 2.

В каждую постановку обязательно включают положительный (ПКО-Туб), отрицательный (ОКО) контрольные образцы и отрицательный контрольный образец выделения (ОКО-В). Для проведения количественного анализа дополнительно используют калибровочные контрольные образцы КО3-Туб, КО5-Туб, КО7-Туб.

Все контроли (исключая ПКО-Туб и ОКО, которые анализируют в одном повторе) и исследуемые образцы анализируют в двух повторах.

Для проведения количественного анализа при использовании набора реагентов «АмплиТуб-РВ» возможны 2 варианта работы:

1. Вариант работы «Калибровка»

Применяется при первом использовании прибора или набора реагентов новой серии.

Исследование проводится с включением трех КО (КО7, КО5, КО3) в повторе с количеством фрагментов IS6110 и regX 10^7 , 10^5 , 10^3 копий на 10 мкл. Количество МБТ в образцах определяется по полученной калибровочной прямой.

2. Вариант работы «Тест»

Применяется, когда уже есть построенная калибровочная прямая для набора реагентов текущей серии.

Исследование проводится с включением только КО (КО3) с количеством 10^3 копий на 10 мкл. В этом случае для определения количества МБТ используются результаты (уравнение калибровочной прямой) первой постановки, а

результат по КОЗ служит критерием достоверности количественного определения неизвестных образцов.

7.2.1. Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ.

1. Взять необходимое количество пробирок с реакционной смесью комплекта для амплификации (РС ОМ АмплиТуб-РВ) из расчета $2 \cdot (N+K)$, где N – количество исследуемых образцов, а K – количество контрольных образцов в данной постановке. Не допускать размораживания и повторного замораживания неиспользованных пробирок со смесью.
2. После размораживания реакционной смеси, центрифугировать пробирки 30-60 с (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 анализа в верхней части стенки пробирки.

Примечание. Запрещается наносить маркировку на крышку пробирок.

4. Положительный, калибровочные, отрицательные контрольные образцы ПЦР и исследуемые образцы разморозить, перемешать на встряхивателе (вортексе) и центрифугировать.

Примечание. Если образец ДНК содержит незначительное количество магнитного сорбента, рекомендуется поставить пробирки на 1 мин. в магнитный штатив.

5. Внести в пробирки по 10 мкл отрицательных контрольных образцов (ОКО и ОКО-В), 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 анализа.

Для корректной работы шаблона для автоматической обработки результатов необходимо использовать следующий порядок образцов.

Вариант работы «Калибровка»:

№ ячейки	Образец
1	КО 7
2	КО 7
3	КО 5
4	КО 5
5	КО 3
6	КО 3
7	ПКО
8	ОКО
9	ОКО-В
10	ОКО-В
11	исследуемый образец 1
12	исследуемый образец 1
13	исследуемый образец 2
14	исследуемый образец 2
15	исследуемый образец 3
16	исследуемый образец 3
...	

Вариант работы «Тест»:

№ ячейки	Образец
1	КО 3
2	КО 3
3	ПКО
4	ОКО
5	ОКО-В
6	ОКО-В
7	исследуемый образец 1
8	исследуемый образец 1
9	исследуемый образец 2
10	исследуемый образец 2
11	исследуемый образец 3
12	исследуемый образец 3
...	

7.2. 2. Проведение реакции ПЦР-РВ

Реакцию ПЦР-РВ проводят согласно инструкции по эксплуатации прибора для ПЦР-РВ. Порядок работы на приборе АНК-32 (или 16) (Россия) изложен в приложении 2. Порядок работы на приборе Rotor Gene 6000 изложен в приложении 3. Порядок работы на приборе iCycler iQ5 Bio-Rad (США) изложен в приложении 4.

1. Устанавливают параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 1 и вводят красители (FAM, ROX и R6G).

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °C – 120 с	1
2	61 °C – 50 с	45
3	95 °C – 15 с	

2. Вводят сведения об образцах по соответствующему красителю. Начинают работу прибора и фиксируют в рабочем журнале название файла.
3. В соответствии с инструкцией к прибору активируют окно приема сигнала флуоресценции по первому (FAM) и третьему (ROX) измерительным каналам (наличие положительной динамики в какой либо лунке свидетельствует о наличии в реакционной смеси специфических фрагментов ДНК возбудителя и позволяет дать предварительное положительное заключение о наличии ДНК микроорганизма в соответствующем образце).
4. Отработанные пробирки утилизируют в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

7.2.3. Обработка результатов работы прибора

После завершения программы проводят расчет и сохранение значений порогового цикла для канала 1 (FAM - для выявления фрагментов ДНК гена IS6110 МБТ), 3 (ROX - для выявления фрагментов ДНК гена *regX3* МБТ) и 2 (R6G - для выявления ВПК-В Ту6) согласно инструкции к прибору. По рассчитанным значениям пороговых циклов для калибровочных образцов КОЗ-Ту6, КО5-Ту6, КО7-Ту6 проводят построение калибровочной прямой и количественный анализ исследуемых образцов. Обработка результатов работы приборов (АНК-32, Rotor Gene 6000, iCycler iQ5 Bio-Rad), используемых для проведения анализа, приведена в соответствующих приложениях 2, 3, 4.

8. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации прибором **ОКО** по каналам **FAM** и **ROX**;
- в случае отсутствия регистрации прибором **ОКО** и **ОКО-В** по каналу **R6G - ВПК-В** Туб;
- в случае отсутствия регистрации прибором **КОЗ-Туб**, **КО5-Туб**, **КО7-Туб** и **ПКО-Туб** по каналам **FAM** и **ROX**.

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации прибором **ОКО** по каналам **FAM** и **ROX**;
- в случае регистрации прибором **ОКО** и **ОКО-В** по каналу **R6G**;
- в случае регистрации прибором **КОЗ-Туб**, **КО5-Туб**, **КО7-Туб** и **ПКО-Туб** по каналам **FAM** и **ROX**.

Регистрация **КОЗ-Туб**, **КО5-Туб**, **КО7-Туб** и **ПКО-Туб** свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК гена *IS6110* и *regX3* МБТ.

Регистрация **ОКО** и **ОКО-В** по каналу **R6G** свидетельствует о выделении ДНК в процессе пробоподготовки и отсутствии ингибиторов ПЦР.

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Образец считается положительным на присутствие специфического фрагмента *IS6110*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **FAM** (зонда, специфичного для гена *IS6110*), а значение порогового цикла меньше 45, и отрицательным, если автоматическое определение значения порогового невозможно.

Образец считается положительным на присутствие специфического фрагмента *regX*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **ROX** (зонда, специфичного для гена *regX3*), а значение порогового цикла меньше 45, и отрицательным, если автоматическое определение значения порогового невозможно.

По каналу **R6G** - ВПК-В Туб - контролируют выделение ДНК в процессе пробоподготовки и наличие в образце ингибиторов реакции амплификации. Образец считается положительным на присутствие ВПК, если значение порогового цикла меньше 45 и отрицательным, если автоматическое определение значения порогового невозможно.

Результат анализа **отрицательного контрольного образца (ОКО)** должен быть отрицательным для реакций на *IS6110* и *regX* (каналы FAM и ROX) и положительным для ВПК (канал R6G). В случае получения положительных результатов для ОКО по реакции на *IS6110* и *regX* результаты определения всех положительных образцов считаются недействительными. В этом случае необходимо повторить постановку и, если это необходимо, провести специальные мероприятия по выявлению и устранению источника контаминации (реактивы для ПЦР и комната для подготовки к проведению реакции).

Результат анализа **отрицательного контрольного образца выделения ОКО-В** должен быть отрицательным для реакций на *IS6110* и *regX* и положительным для ВПК. Допускается получение положительного результата по каналу *IS6110* с пороговым циклом более 35 при отсутствии какого-либо роста флуоресценции по каналу *regX*. В случае получения положительных результатов для ОКО-В и по реакции на *IS6110* и по реакции *regX* результаты определения всех положительных образцов считаются недействительными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации (реактивы и помещение для выделения ДНК) и провести повторное выделение и анализ всех положительных проб.

Для оценки количества выявленной ДНК микобактерий туберкулезного комплекса используются **контрольные калибровочные образцы** с известной концентрацией, позволяющей определить число копий фрагмента *IS6110* и *regX3* ДНК микобактерий туберкулезного комплекса. По окончании реакции в программе прибора для ПЦР-РВ по флуоресценции калибровочных образцов в соответствующих каналах строятся калибровочные прямые для оценки копий фрагментов *IS6110* и *regX3*.

Для калибровочной прямой должны выполняться **ВСЕ** ниже перечисленные условия:

- коэффициент корреляции R^2 не ниже 0,99;
- коэффициент A калибровочной прямой лежит в диапазоне от - 0,25 до - 0,35;
- эффективность ПЦР составляет не менее 90%.

Получение иных значений этих параметров для калибровочной прямой свидетельствует об ухудшении работы реактивов или неправильной подготовке к проведению реакции.

Число копий для неизвестных образцов рассчитывается автоматически по построенной калибровочной прямой.

Результаты анализа исследуемых образцов принимаются только при выполнении ВСЕХ вышеперечисленных условий для контрольных образцов!

Результат анализа на обнаружение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса считается :

1. **Положительным**, если реакция на *IS6110* и *regX* или каждая отдельно оценены как положительные.
2. **Отрицательным**, если реакция на *IS6110* и *regX* оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как положительная, разница пороговых циклов между реакцией на ВПК для ОКО и ВПК исследуемого образца более двух.
3. **Недостоверным**, если реакция на *IS6110* и *regX* оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как отрицательная. Следовательно, образец заингибирован, и необходимо либо его предварительное разведение перед реакцией амплификации, либо перевыделение ДНК.
4. **Недостоверным**, если реакция на *IS6110* и *regX* оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как положительная, разница

пороговых циклов между реакцией на ВПК для ОКО и ВПК исследуемого образца менее двух.

Для положительных образцов проводится автоматическое определение количества микобактерий туберкулезного комплекса. Результат исследования на определение количества микобактерий туберкулезного комплекса в пробе считается:

1. Точным, если количество лежит в пределах расчета по калибровочной прямой.
2. Приблизительным и лежащим вне диапазона количественного определения, если количество лежит вне пределов расчета по калибровочной прямой.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при автоматическом анализе с использованием шаблона для автоматической обработки результатов анализа приводится в Приложении 5.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

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

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

11.1. После получения набор «АмплиТуб-РВ» необходимо разукomплектовать на составляющие комплекты № 1 и № 2 для дальнейшего хранения и использования.

11.2. Комплект реагентов для выделения ДНК (комплект № 1) следует хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

11.3. Комплект реагентов для постановки ПЦР-РВ (комплект № 2) следует хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре от минус 18 до минус 20 °С в течение всего срока годности набора.

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

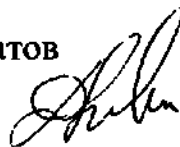
Рекламации на качество наборов направлять в ФГУН Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских и иммунологических препаратов (ГИСК) им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора по адресу: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22 и на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» по адресу: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

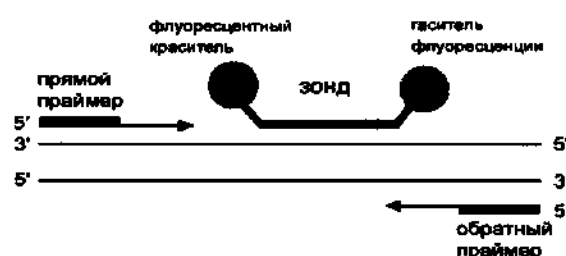


Д.Т.Леви

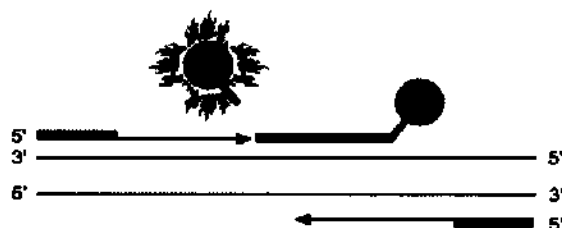
Описание метода ПЦР-РВ и реакций, используемых в наборе «АмплиТуб-РВ»

Обнаружение фрагментов ДНК микобактерий туберкулезного комплекса основано на использовании метода полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В основе метода ПЦР-РВ лежит изменение сигнала флуоресценции в ходе реакции. Это изменение происходит благодаря использованию специфического для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда, который, подобно праймеру, в ходе реакции связывается с одной из цепей ампликона.

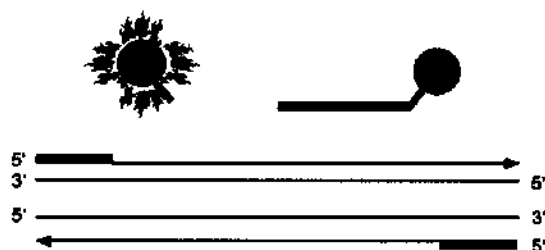
Зонд содержит на 5' конце флуоресцентный краситель, а на 3' конце - гаситель флуоресценции.



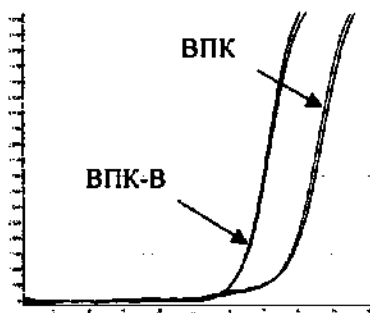
В ходе синтеза комплиментарной цепи, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется.



После расщепления происходит разобщение красителя и гасителя, что приводит к пропорциональному по отношению к накопленному продукту реакции возрастанию сигнала флуоресценции.



Изменение сигнала флуоресценции позволяет проследить кинетику ПЦР и использовать полученные данные для расчета значения порогового цикла – величины, лежащей в основе рас-



чета исходного числа копий ДНК в образце и позволяющей сравнивать образцы между собой.

В данном наборе используются **три независимых реакции**, которые проводятся в одной пробирке одновременно.

Первая реакция позволяет обнаружить специфический фрагмент ДНК *IS6110*, который присутствует во множестве копий в большинстве штаммов микобактерий туберкулезного комплекса, но также может отсутствовать в геноме *Mycobacterium tuberculosis*. Наличие положительной динамики изменения флуоресценции по отношению к отрицательному контролю для этой реакции говорит о наличии в образце ДНК искомого организма. Для обнаружения ДНК *IS6110* используется зонд, меченный красителем FAM.

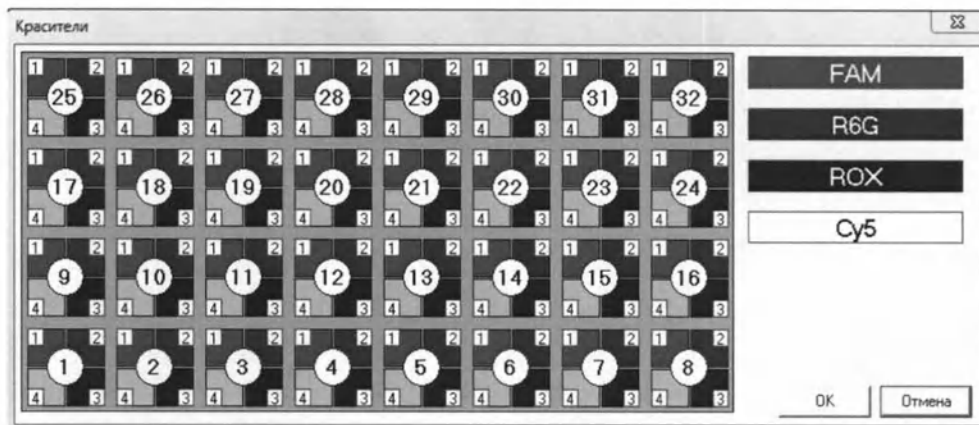
Вторая реакция позволяет обнаружить и определить количество специфического фрагмента ДНК *regX*, представленного в геноме микобактерий туберкулезного комплекса одной копией. Наличие положительной динамики изменения флуоресценции по отношению к отрицательному контролю для этой реакции говорит о наличии в образце ДНК микроорганизма. Сопоставление с динамикой изменения флуоресценции калибровочных образцов путем анализа полученных кинетических кривых позволяет оценить исходное количество микроорганизма в пробе. Для обнаружения и определения количества ДНК *regX* используется зонд, меченный красителем ROX.

Использование двух независимых реакций на различные участки генома микобактерий туберкулезного комплекса позволяет увеличить специфичность и надежность проводимого анализа. Чувствительность набора реагентов – не менее 50 копий в пробе ДНК. Диапазон количественного определения составляет от 10^3 до 10^7 копий ДНК в пробе ДНК.

Третья реакция позволяет обнаружить ДНК внутреннего положительного контроля и внутреннего положительного контроля выделения (ВПК-В) и оценить эффективность выделения освобожденной в процессе лизиса и депротеинизации ДНК, эффективность реакции ПЦР и исключить недостоверные результаты. Положительная динамика изменения флуоресценции по этой реакции в случае отсутствия положительной динамики по первой и второй реакции подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в пробе.

ДНК ВПК-В – это дополнительная ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК), по отношению к уже имеющейся в реакционной смеси в каждой ПЦР пробирке. Она попадает в пробирку с пробой, прошедшей этап выделения. Сравнение значений порогового цикла пробы не прошедшей выделения (например, для отрицательного контроля ПЦР) и пробы прошедшей выделения позволяет оценить эффективность процесса выделения.

Отсутствие положительной динамики изменения флуоресценции по всем трем реакциям свидетельствует об ингибировании ПЦР, что позволяет исключить недостоверный отрицательный результат. Для обнаружения ДНК ВПК и относительного количественного сравнения с ДНК ВПК-В используется зонд, меченный красителем **R6G**.



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

Лунки № 1-2: КО7

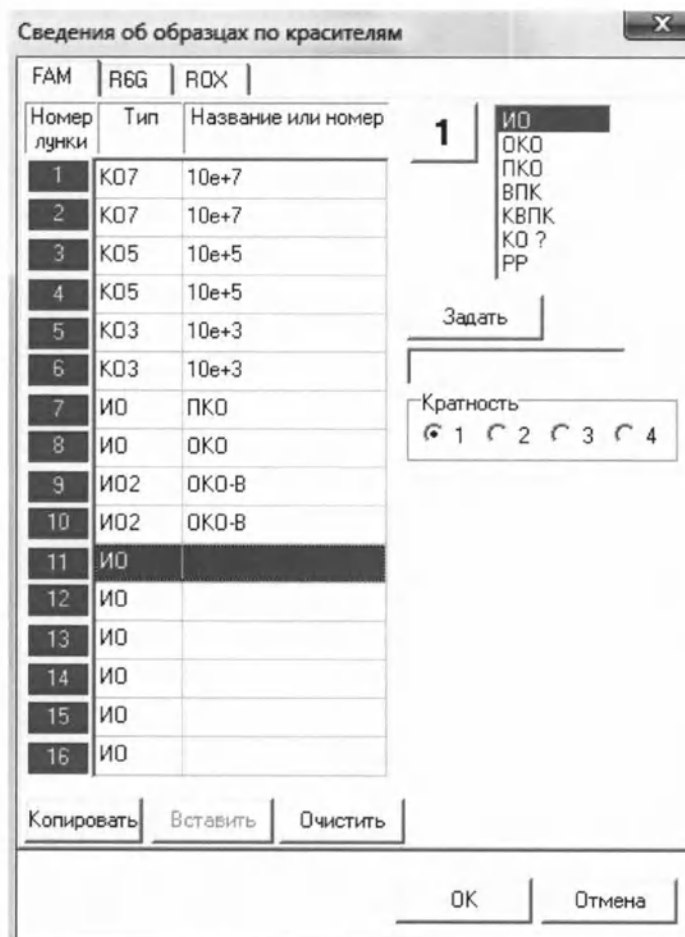
Лунки № 3-4: КО5

Лунки № 5-6: КО3

Лунка № 7: ПК0

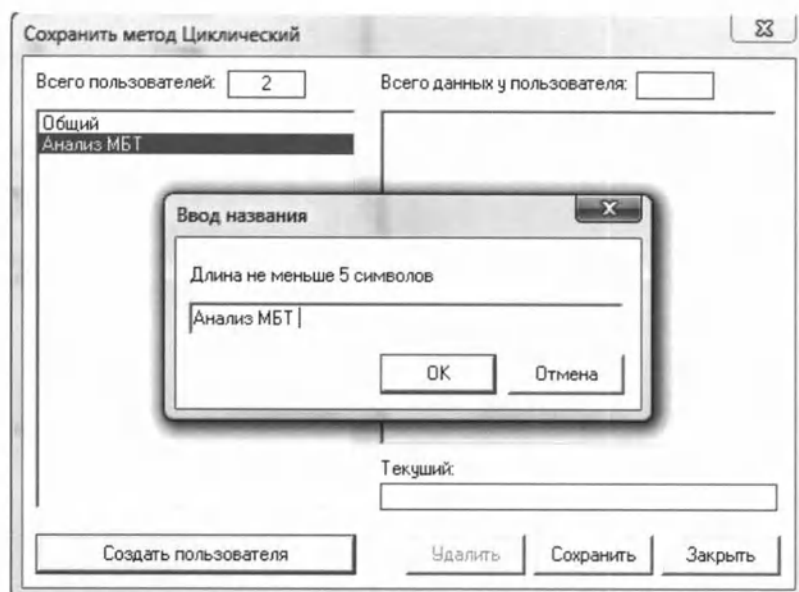
Лунка № 8: ОК0

Лунки № 9-10: ОК0-В



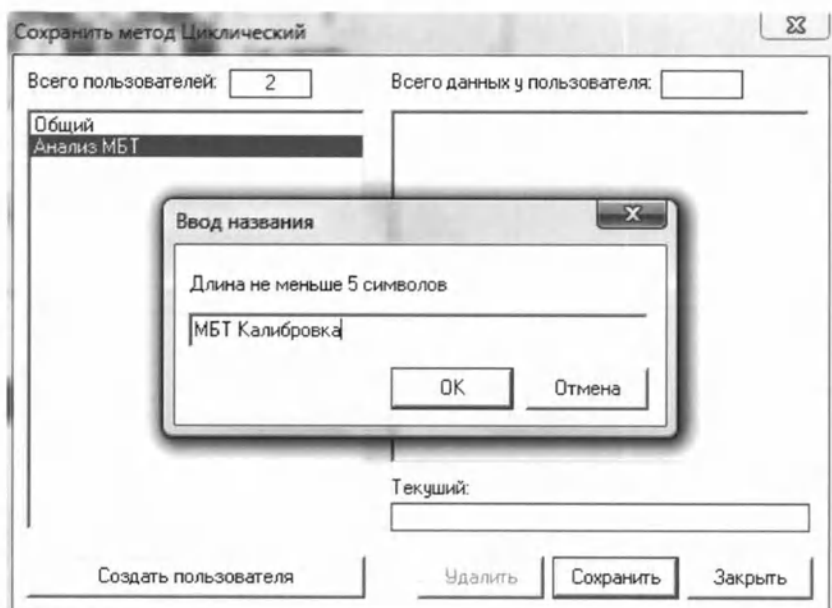
Нажать клавишу «OK».

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



Если указанная папка уже существует, выбрать ее щелчком мыши.

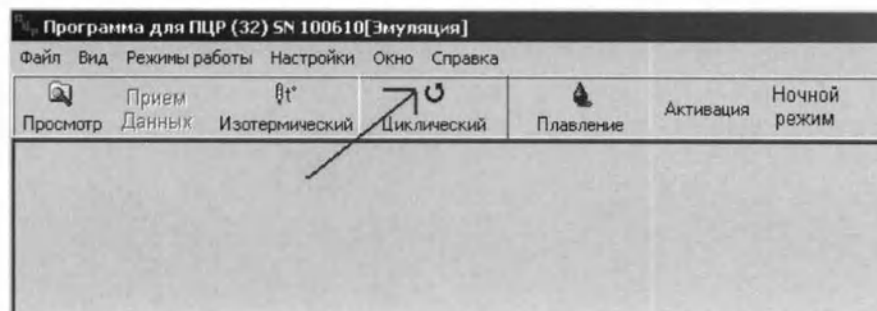
Нажать клавишу «Сохранить», ввести название протокола **«МБТ Калибровка»** и нажать «ОК»:



7. При дальнейшей работе использовать созданный метод.

Создание протокола «МБТ Тест»

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

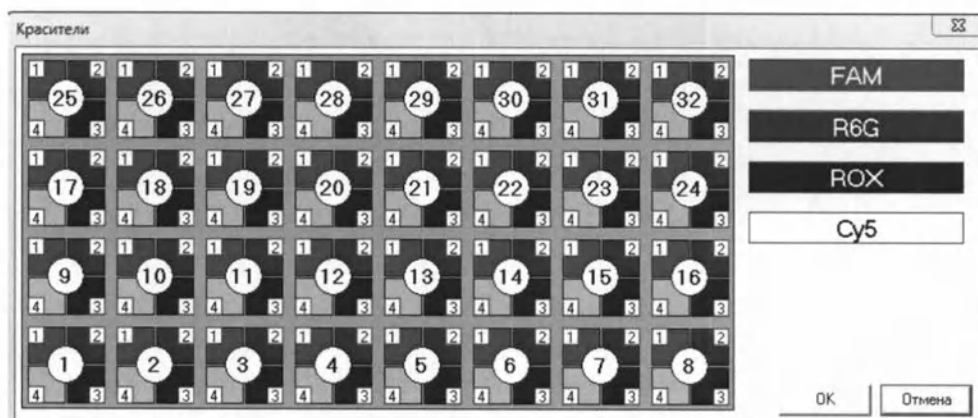


3. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору **здать программу** амплификатора со следующими параметрами:

Номер ступени	Температура	Время	Кол-во циклов	Метки циклов
1	95	120	1	
2	61	50	45	Начало
3	95	15	45	Конец



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

Лунки № 1-2: КОЗ
 Лунка № 3: ПКО
 Лунка № 4: ОКО
 Лунки № 5-6: ОКО-В

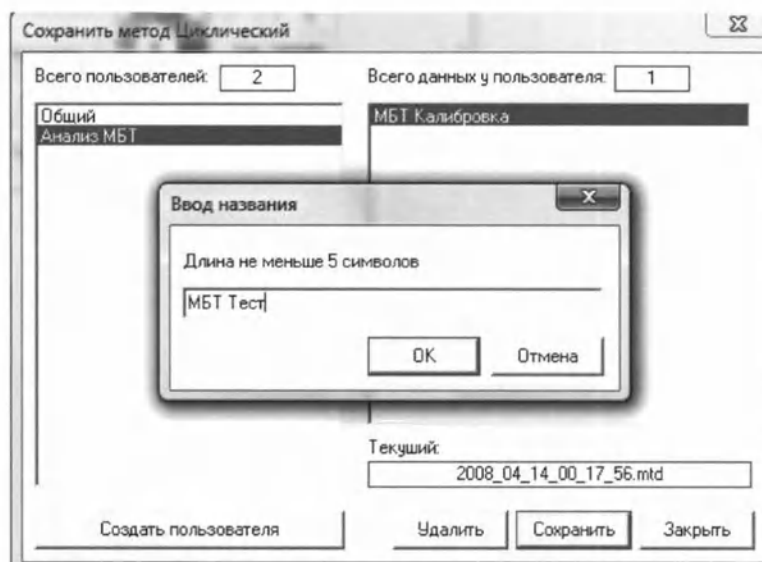
Номер лунки	Тип	Название или номер
1	ИО2	1000
2	ИО2	1000
3	ИО	ПКО
4	ИО	ОКО
5	ИО2	ОКО-В
6	ИО2	ОКО-В
7	ИО	
8	ИО	
9	ИО	
10	ИО	
11	ИО	
12	ИО	
13	ИО	
14	ИО	
15	ИО	
16	ИО	

Нажать клавишу «OK».

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

Если указанная папка уже существует, выбрать ее щелчком мыши.

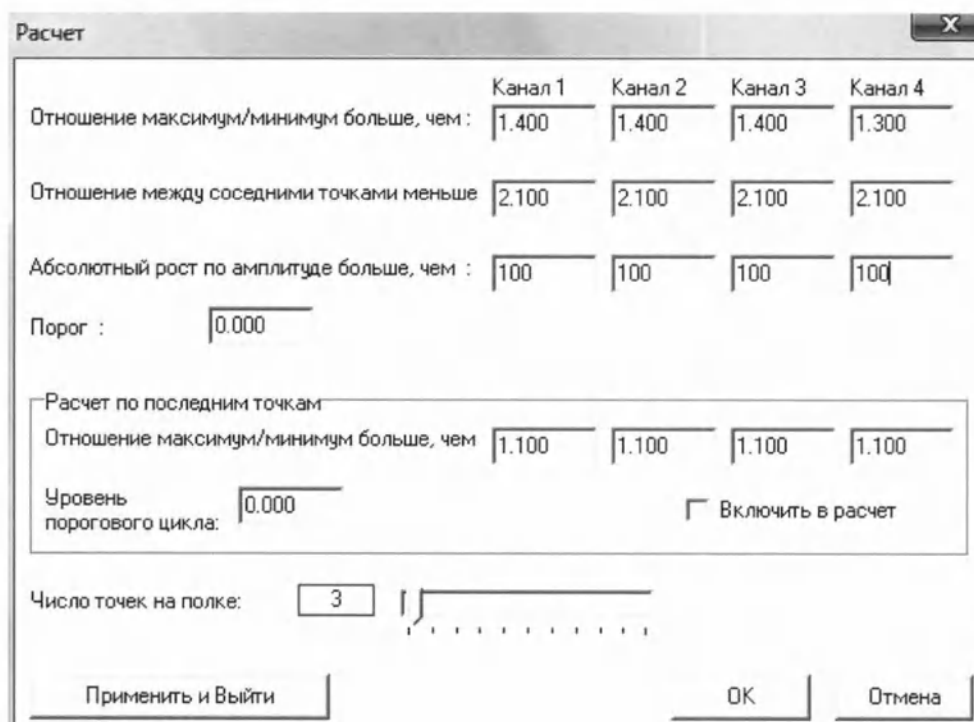
Нажать клавишу «Сохранить», ввести название протокола «МБТ Тест» и нажать «ОК»:



7. При дальнейшей работе использовать созданный метод.

Настройка параметров расчета

В программе «ПЦР» для АНК-32 выбрать опцию «Настройки» и затем «Расчет». Привести окно «Расчет» к следующему виду:



Нажать клавишу «ОК».

Организация отчетных файлов описана в приложении 5.

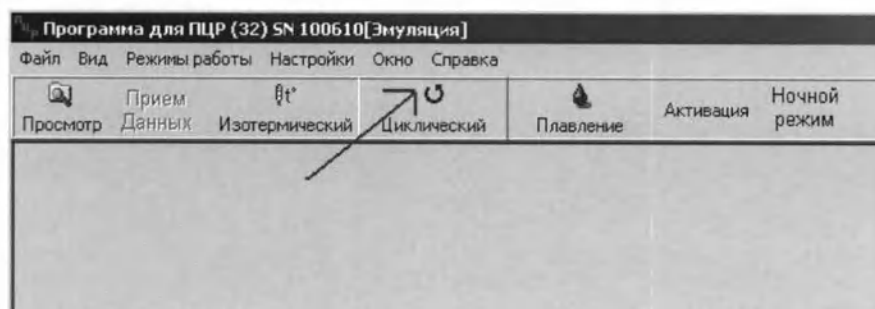
Порядок работы, учета и интерпретации результатов анализа на приборе АНК-32 (Россия)

Подготовка к работе

В случае первого использования прибора АНК-32 или переустановки программы необходимо создать **2 новых протокола** – «МБТ Калибровка» и «МБТ Тест».

Создание протокола «МБТ Калибровка»

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	120	1	
2	61	50	45	Начало
3	95	15	45	Конец

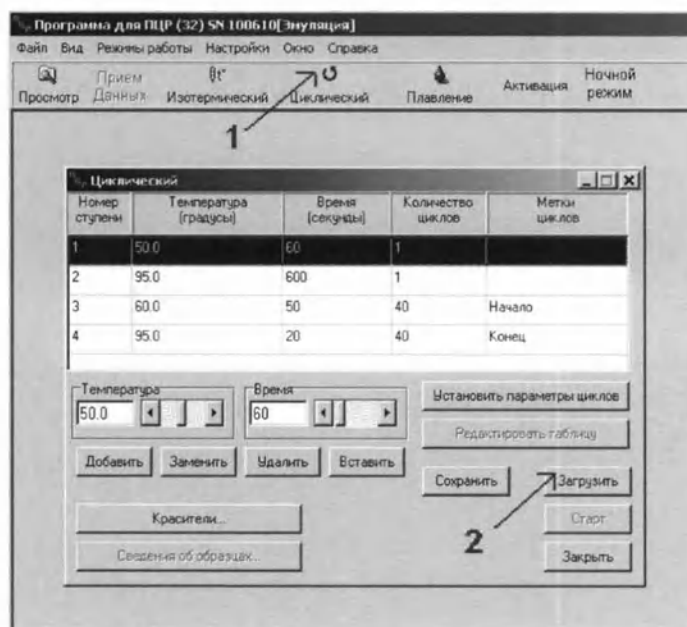


4. Нажать клавишу «*Красители*», выбрать в появившемся окне красители **FAM, R6G и ROX** и нажать «ОК».

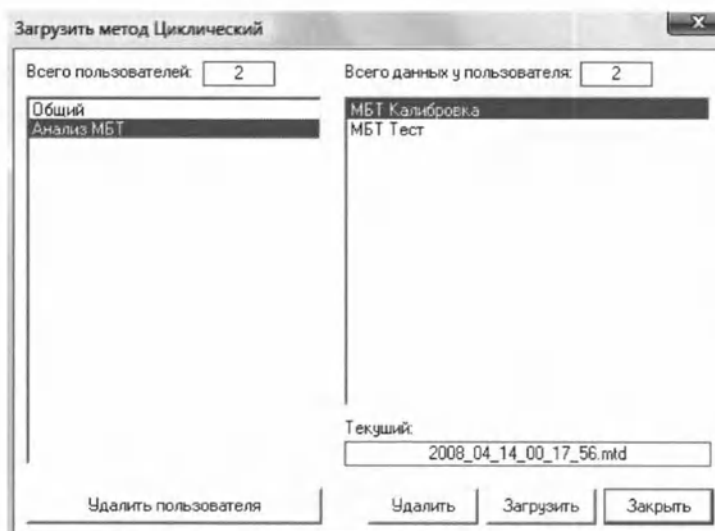
Проведение анализа. Вариант «МБТ Калибровка».

Порядок следования образцов при варианте анализа «МБТ Калибровка» и подготовка к проведению ПЦР-РВ описан в основной инструкции.

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «ПЦР» для прибора АНК-16/32.
3. Выбрать режим работы «Циклический», нажать клавишу «Загрузить»



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



5. В появившемся окне «Красители» проверить установку красителей FAM, R6G и ROX и нажать «ОК».
6. Начать работу прибора нажатием кнопки «Старт».

- После загрузки и начала работы прибора в окне «Прием данных» нажать клавишу «Образцы». В появившемся окне выбрать краситель **FAM**, перейти на лунку № 11 и последовательно внести названия образцов.

Номер лунки	Тип	Название или номер
1	K07	10e+7
2	K07	10e+7
3	K05	10e+5
4	K05	10e+5
5	K03	10e+3
6	K03	10e+3
7	ИО	ПКО
8	ИО	ОКО
9	ИО2	ОКО-В
10	ИО2	ОКО-В
11	ИО	1
12	ИО	2
13	ИО	
14	ИО	
15	ИО	
16	ИО	

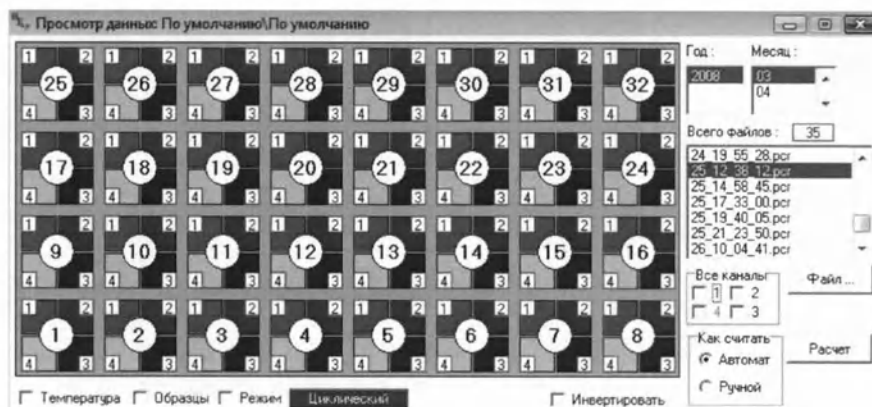
Нажать клавишу «Копировать», перейти на краситель **R6G**, нажать клавишу «Вставить», перейти на краситель **ROX**, нажать клавишу «Вставить» и «OK».

- Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

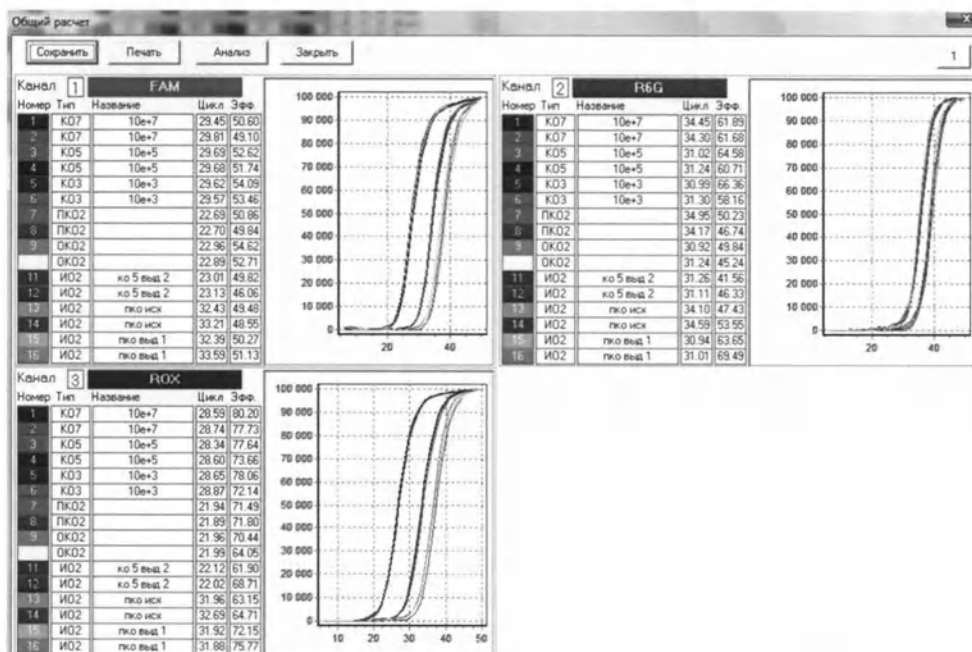
- Отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

Расчет значений порогового цикла

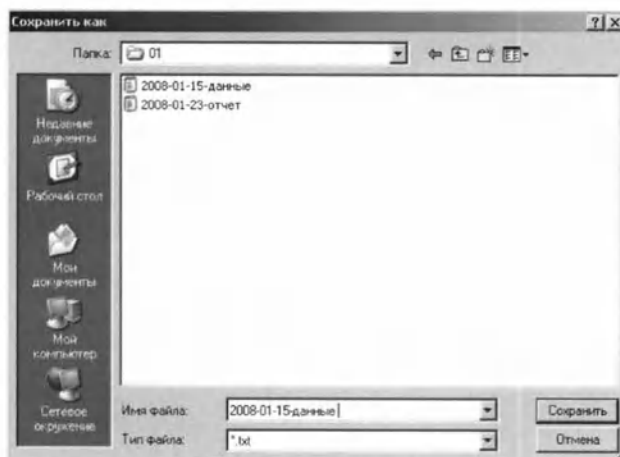
- После завершения реакции, нажать клавишу «Просмотр».
- Выбрать файл, содержащий данные работы прибора, щелчком левой кнопки мыши.



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» → «МБТ» → «Отчеты» → «Год» → «Месяц», в поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число.данные». Нажать «Сохранить»:



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

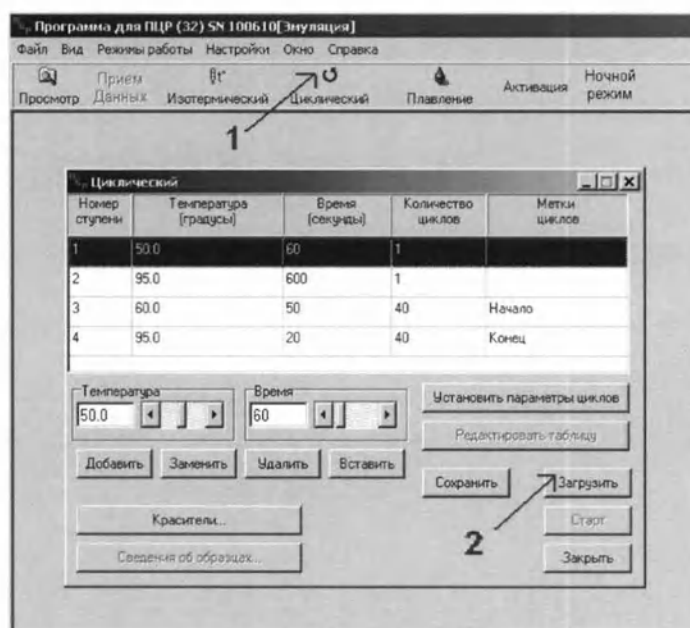
5. Закроить или свернуть программу «ПЦР».

Обработка результатов ПЦР-РВ с помощью шаблона в программе Excel описана в приложении 5.

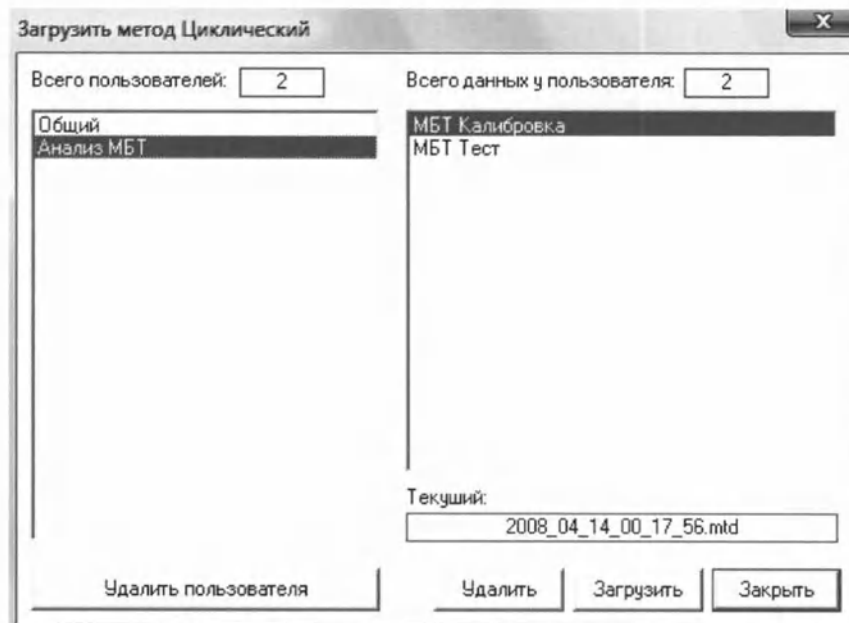
Проведение анализа. Вариант «МБТ Тест»

Порядок следования образцов при варианте анализа «МБТ Тест» и подготовка к проведению ПЦР-РВ описан в основной инструкции.

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «ПЦР» для прибора АНК-16/32.
3. Выбрать режим работы «Циклический», нажать клавишу «Загрузить»



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



5. В появившемся окне «Красители» проверить установку красителей **FAM**, **R6G** и **ROX** 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**, перейти на лунку № 11 и последовательно внести названия образцов.

Сведения об образцах по красителям

FAM	R6G	ROX
Номер лунки	Тип	Название или номер
1	ИО2	1000
2	ИО2	1000
3	ИО	ПКО
4	ИО	ОКО
5	ИО2	ОКО-В
6	ИО2	ОКО-В
7	ИО	1
8	ИО	
9	ИО	
10	ИО	
11	ИО	
12	ИО	
13	ИО	
14	ИО	
15	ИО	
16	ИО	

1 ИО
ОКО
ПКО
ВПК
КВПК
КО ?
РР

Задать

1

Кратность
1 2 3 4

Копировать Вставить Очистить

OK Отмена

8. Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

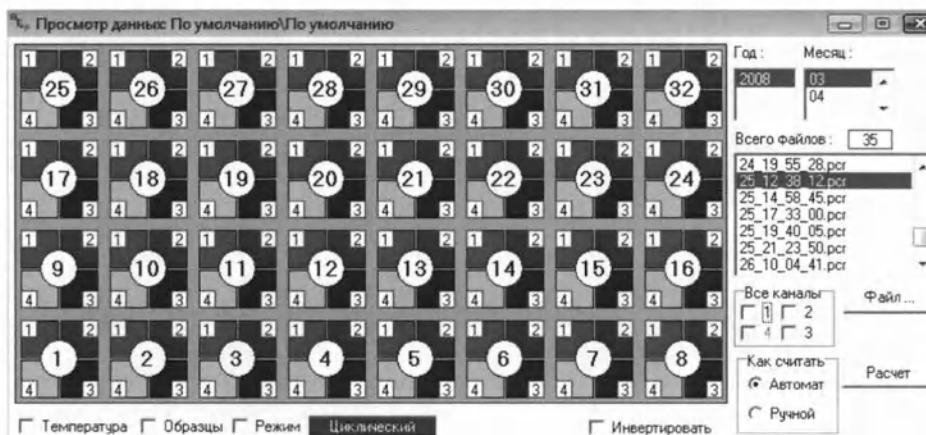
1	2	1	2	1	2	1	2
1	2	1	2	1	2	1	2
4	3	4	3	4	3	4	3

Данные в файле FILE5\2008\04\07_08_22_52.pcr

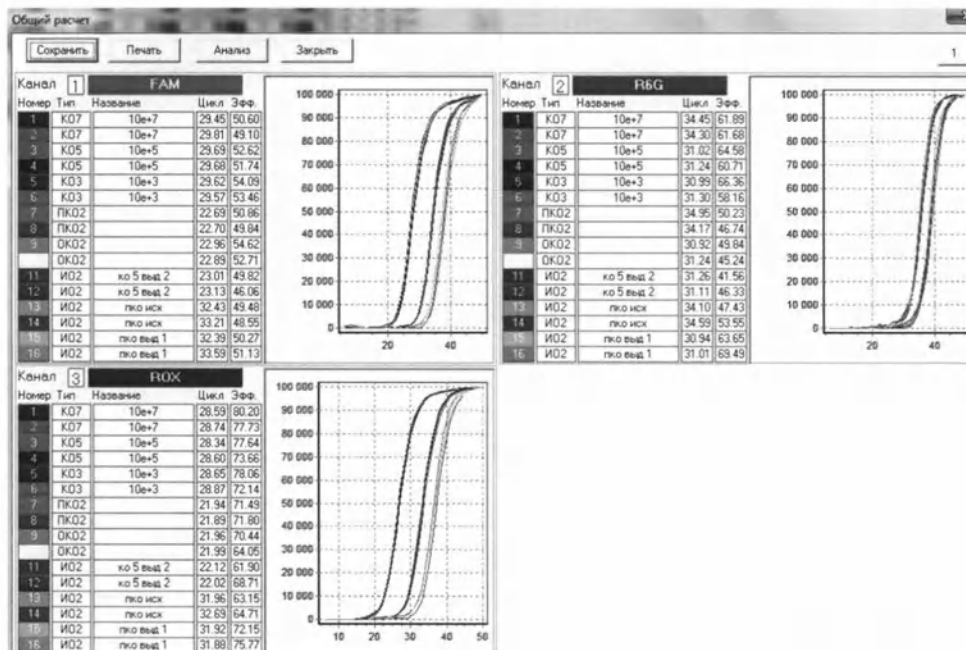
9. Отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

Расчет значений порогового цикла

1. После завершения реакции, нажать клавишу «Просмотр».
2. 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»** → **«МБТ»** → **«Отчеты»** → **«Год»** → **«Месяц»**, в поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число-данные». Нажать «Сохранить»:



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

6. Заккрыть или свернуть программу «ПЦР».

Обработка результатов ПЦР-РВ с помощью шаблона в программе Excel описана в приложении 5.

Порядок работы, учета и интерпретации результатов анализа на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия)

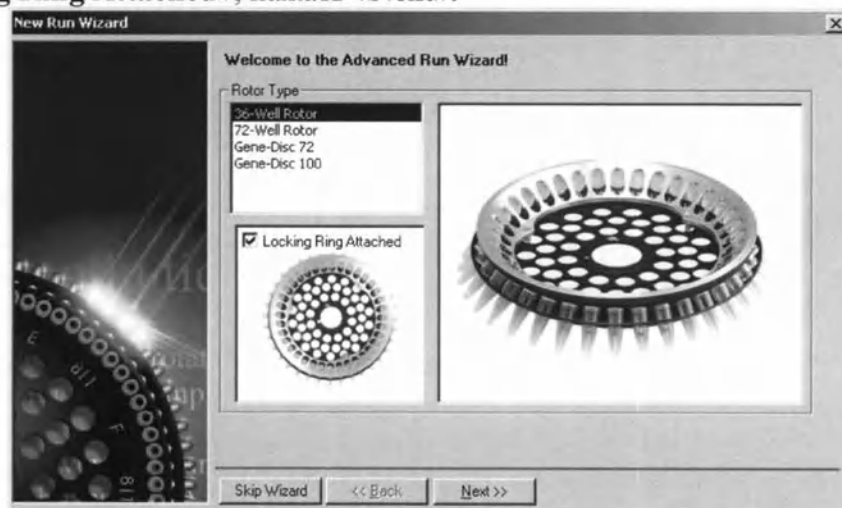
Подготовка к работе

В случае первого использования прибора **RotorGene 6000** или переустановки программы необходимо создать **новый протокол** – «МБТ».

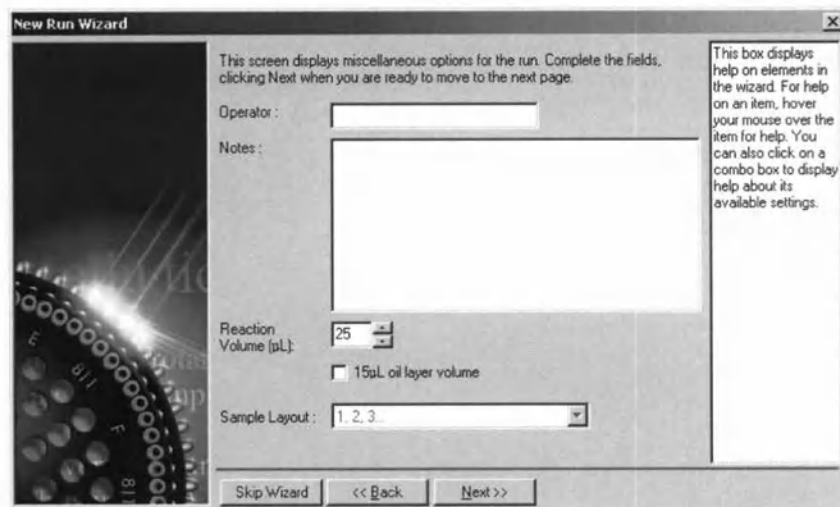
1. Открыть **программу «ПЦР»** для прибора **RotorGene 6000**.
2. Выбрать в открывшемся окне «New Run» действие «Empty Run» и нажать «New».



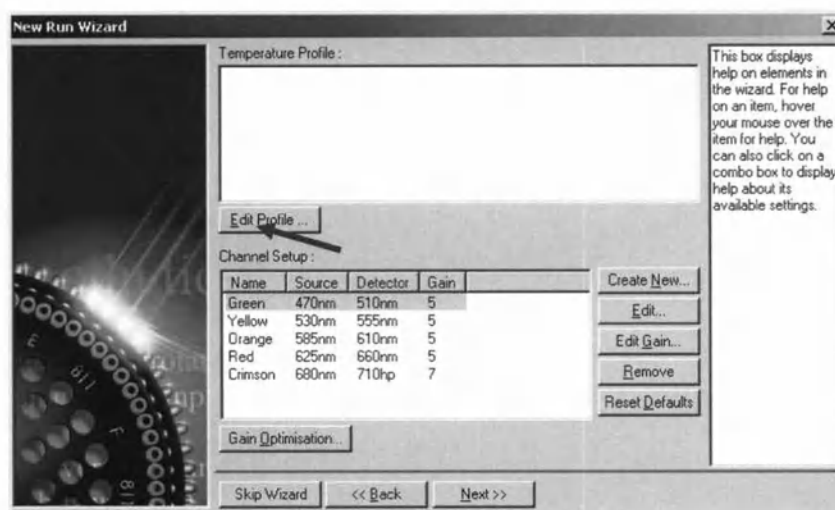
3. В открывшемся окне выбрать необходимый тип ротора поставить галочку в окне «Locking Ring Attached», нажать «Next».



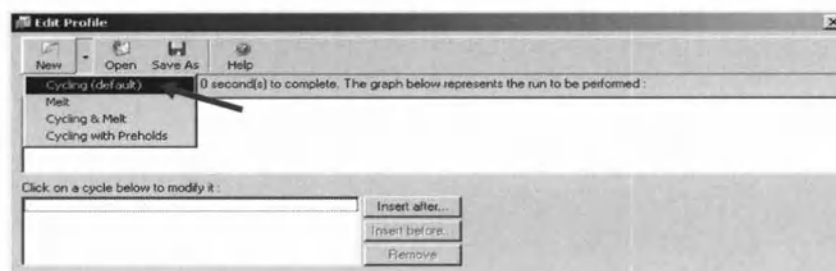
4. В открывшемся окне при необходимости заполнить поля «Operator», «Notes», в окне «Reaction Volume» установить значение **25** и нажать «Next».



5. В открывшемся окне нажать кнопку «Edit Profile».

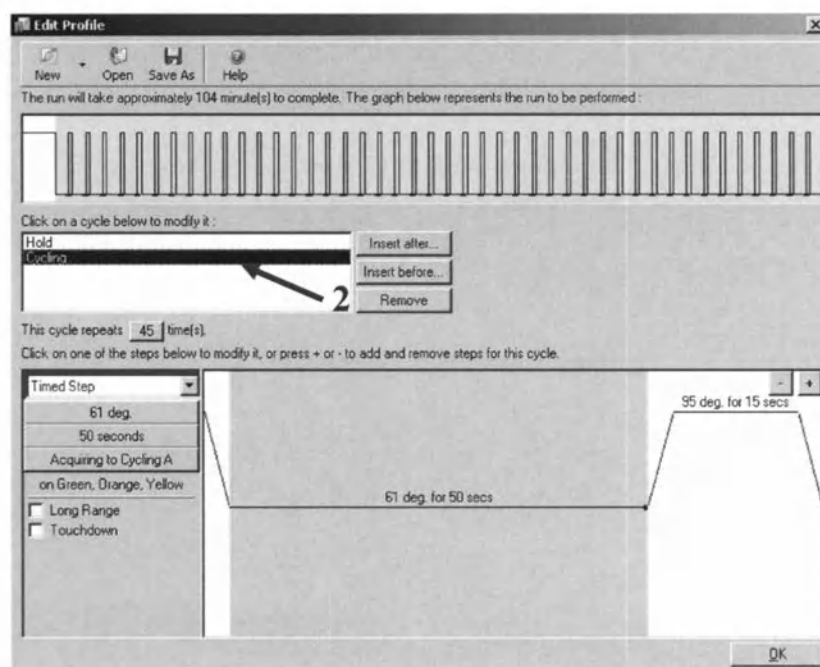
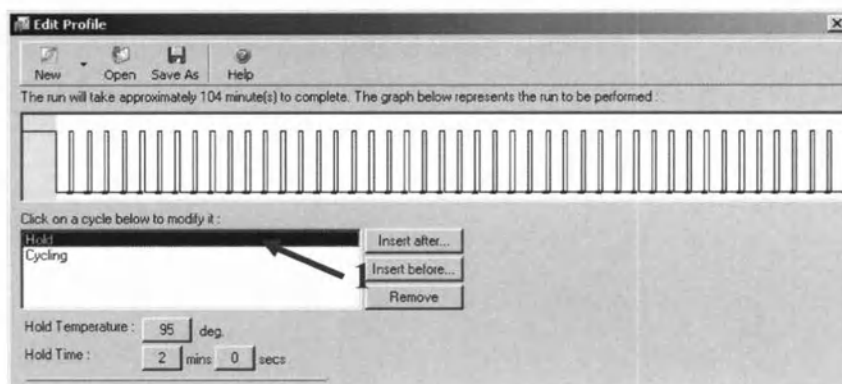


6. В открывшемся окне нажать треугольник справа от кнопки «New» и выбрать «Cycling (default)».



7. В появившемся окне «Edit Profile» задать программу амплификации со следующими параметрами:

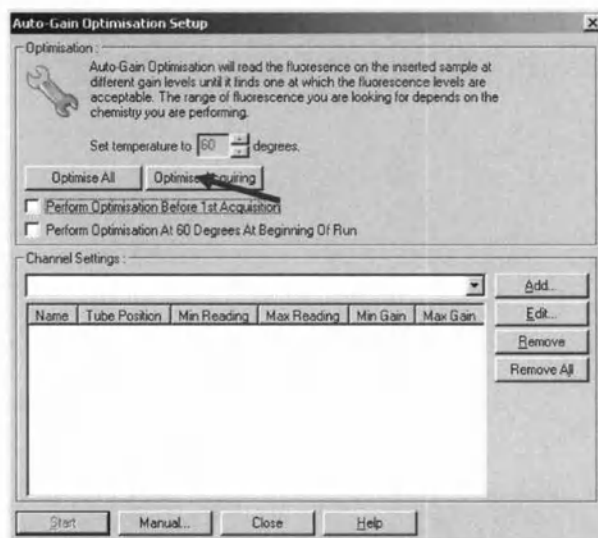
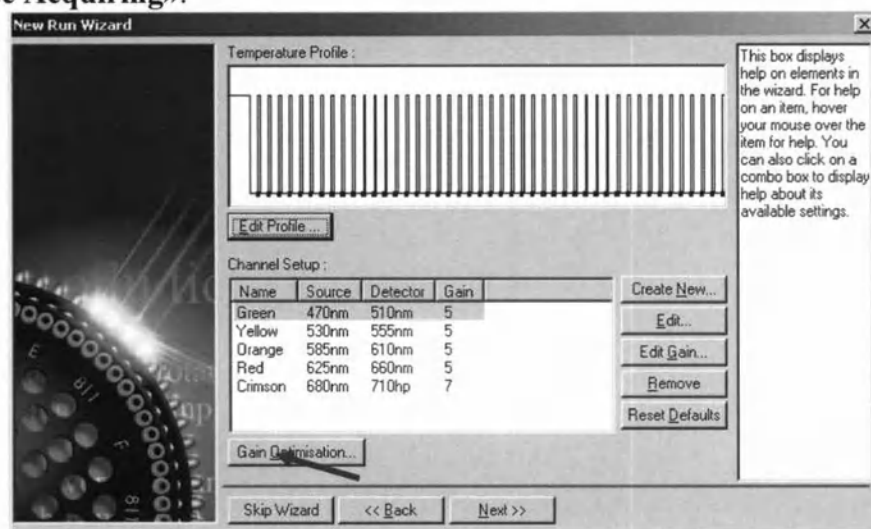
Шаг	Температура, °C	Время	Детекция	Кол-во повторов
Hold	95	2 mins	No acquiring	1
Cycling	61	50 secs	Acquiring	45
	95	15 secs	No acquiring	



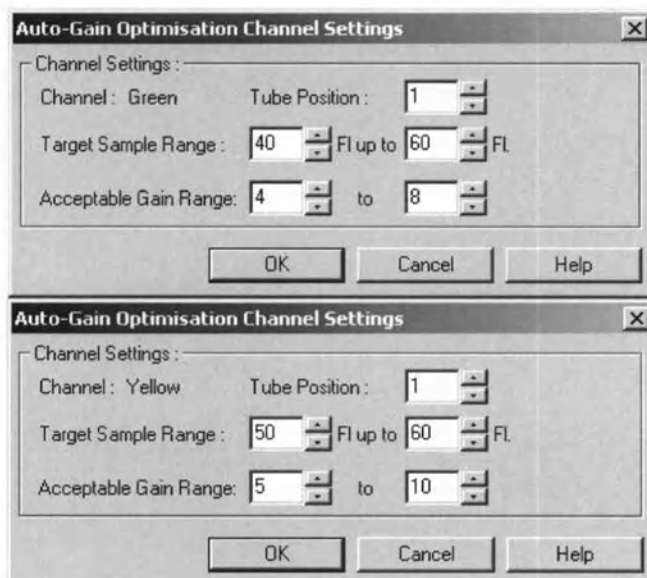
8. Для температуры 61°C в окне «Acquisition» выбрать каналы красителей «Green», «Orange» и «Yellow». Нажать кнопку «OK».

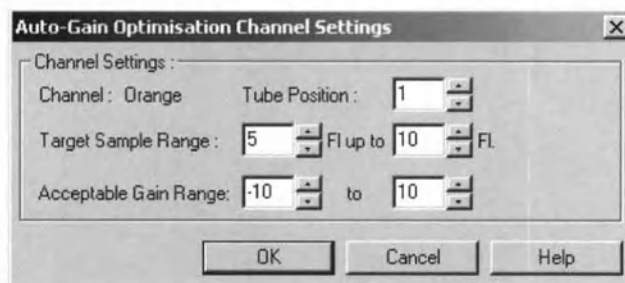


9. В окне «Edit Profile» нажать кнопку «OK».
10. В открывшемся окне «New Run Wizard» нажать кнопку «Gain Optimisation», затем «Optimise Acquiring».

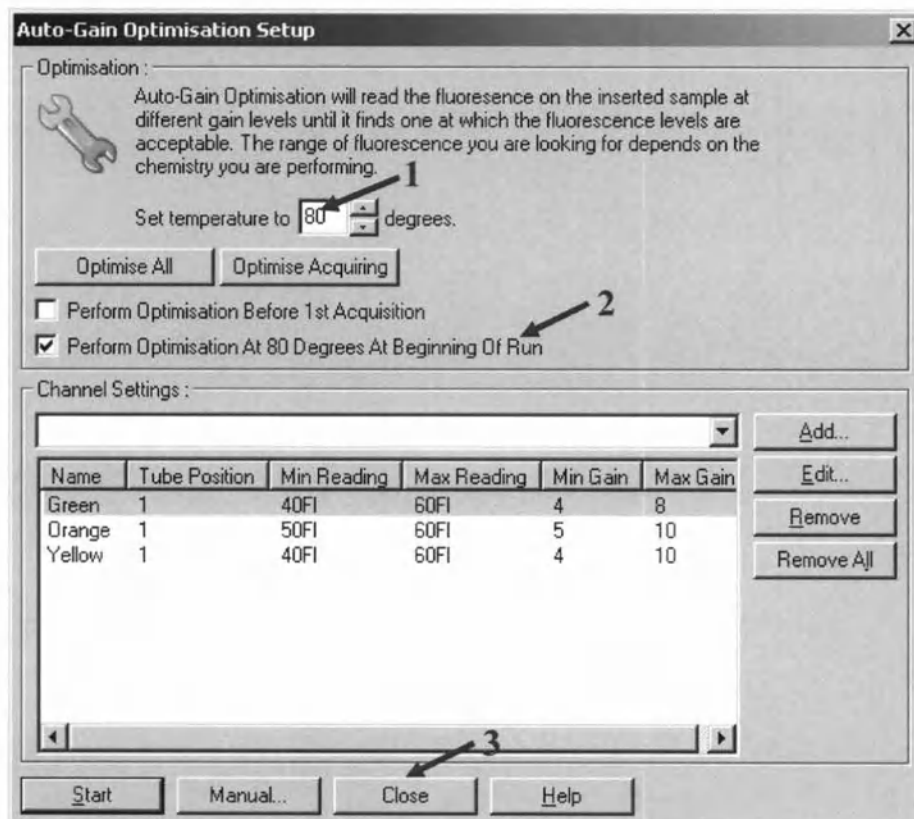


11. Установить следующие значения для каналов «Green», «Orange» и «Yellow»:

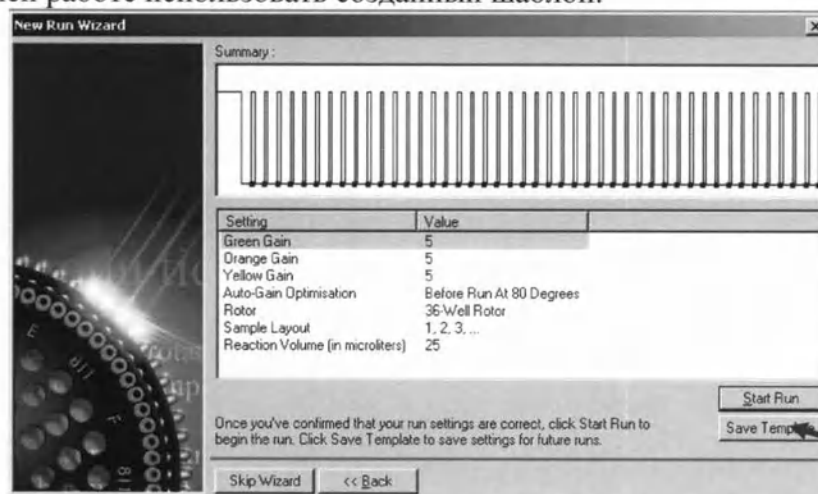




12. В открывшемся окне «**Auto-Gain Optimization Setup**» установить температуру 80 градусов и поставить галочку в окне «**Perform Optimisation At 80 Degrees....**». Нажать клавишу «**Close**».



13. В открывшемся окне нажать клавишу «**Next**», затем «**Save Template**». Сохранить шаблон с названием «**МБТ**» в папке «**Rotor-Gene/Software/Templates**». При дальнейшей работе использовать созданный шаблон.

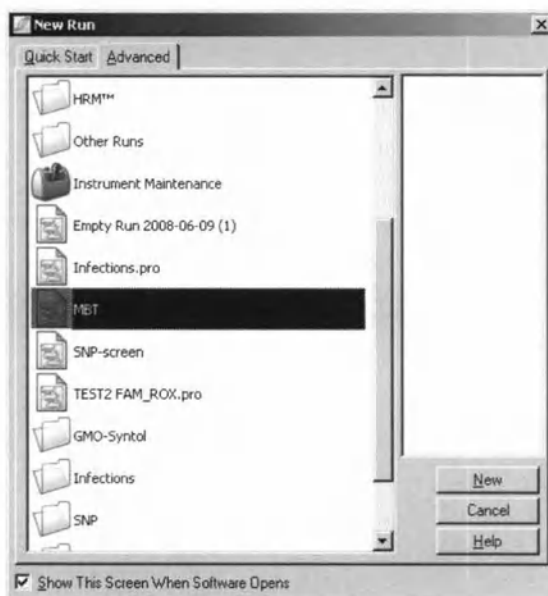


Организация отчетных файлов описана в приложении 5.

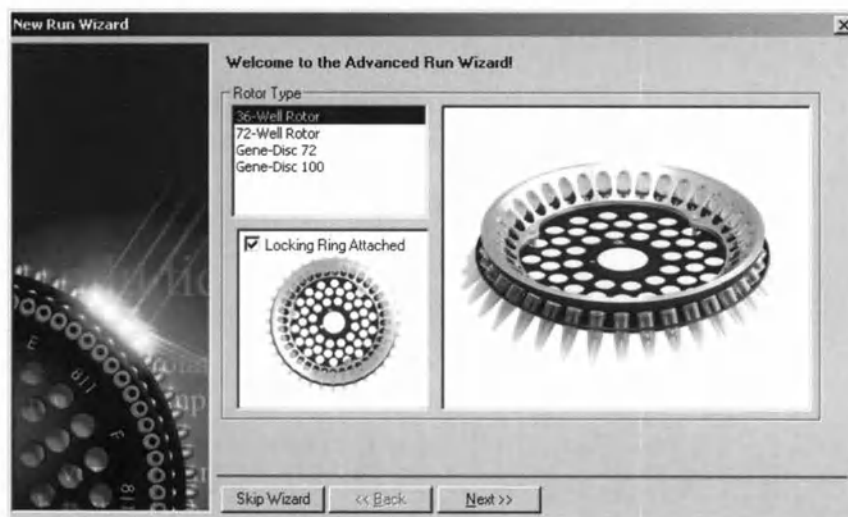
Проведение анализа. Варианты «МБТ Калибровка», «МБТ Тест».

Порядок следования образцов при вариантах анализа «МБТ Калибровка» и «МБТ Тест» и подготовка к проведению ПЦР-РВ описан в основной инструкции.

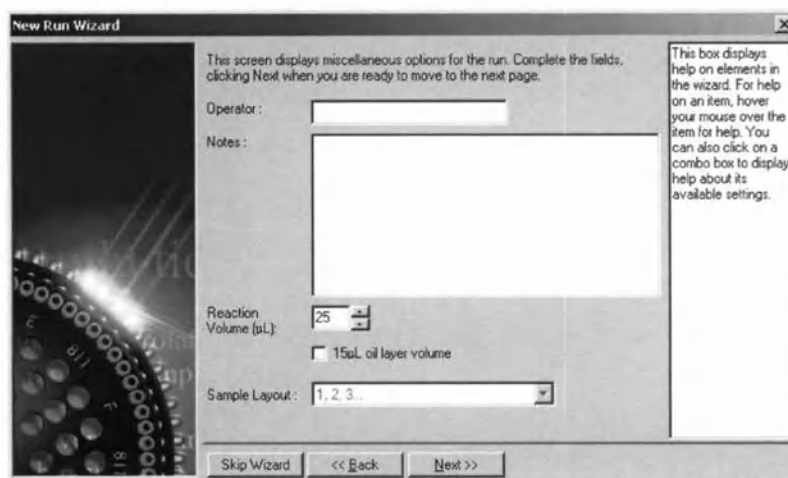
1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Открыть *программу* «Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7» прибора, запустив файл Rotor-Gene.exe
3. Выбрать в открывшемся окне «New Run» шаблон «МБТ» и нажать «New».



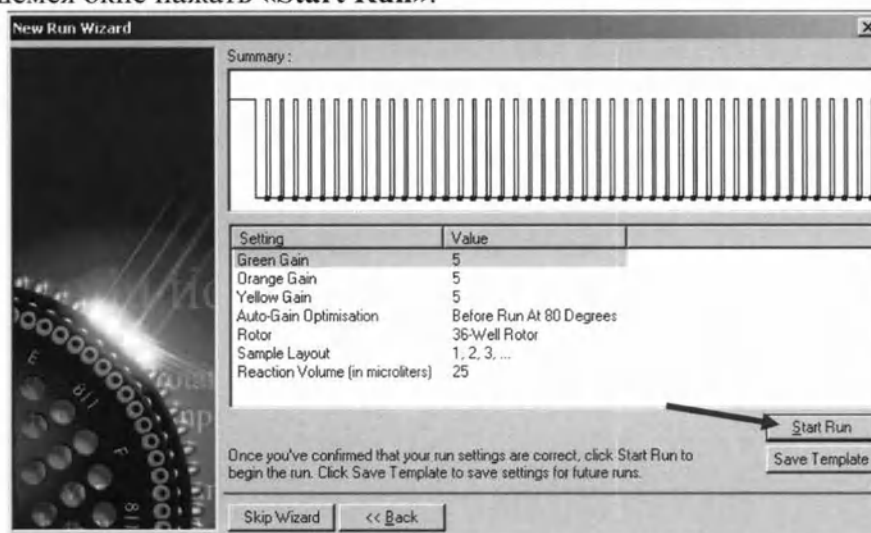
4. В открывшемся окне «New Run Wizard» выбрать необходимый тип ротора и поставить галочку в окне «Locking Ring Attached», нажать клавишу «Next».



5. В открывшемся окне при необходимости заполнить поля «Operator», «Notes», в окне «Reaction Volume» установить значение 25 и нажать клавишу «Next».



6. В открывшемся окне нажать клавишу «Next».
7. В открывшемся окне нажать «Start Run».



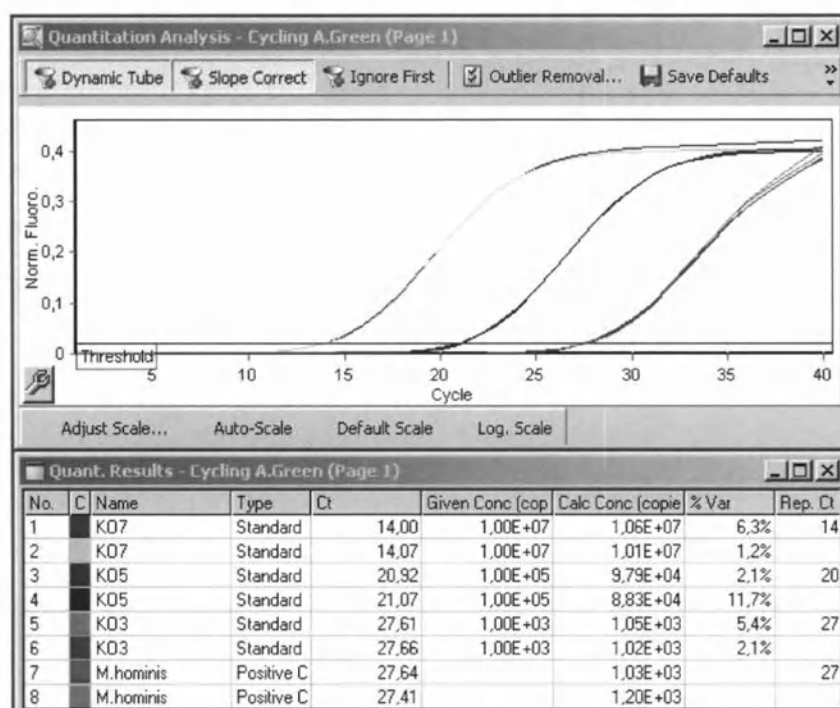
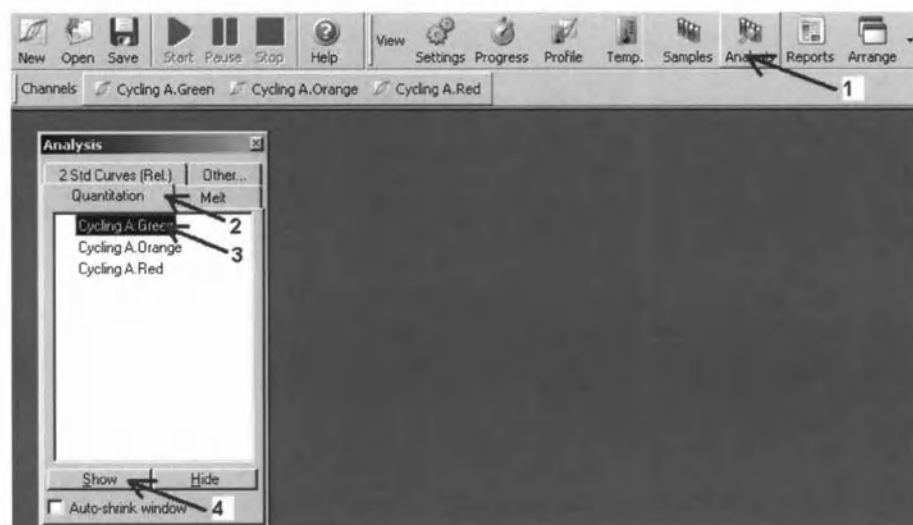
8. Сохранить исследование на Рабочем столе в папке МБТ\Отчеты\год. Зафиксировать название файла в рабочем журнале.
9. В открывшемся окне ввести названия контрольных и исследуемых образцов в соответствии с порядком следования образцов.
10. Нажать клавишу «Finish».

Внимание! Для корректной работы шаблона для автоматической обработки результатов ПЦР не отключать пустые лунки.

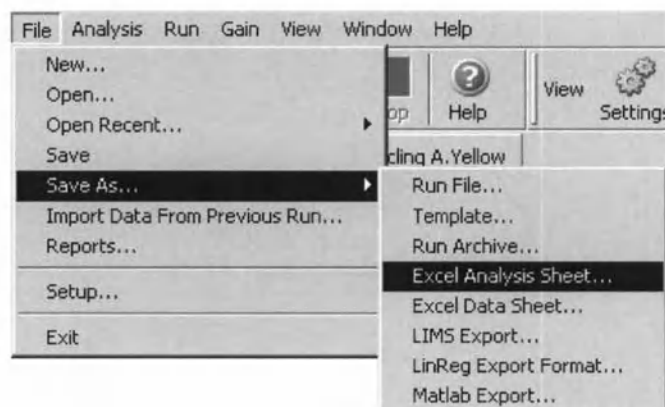
11. Отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

Расчет значений порогового цикла

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе «Rotor-Gene». Для этого нажать клавишу «Open», выбрать файл и нажать «Открыть».
2. Нажать в меню клавишу «Analysis», выбрать закладку «Quantitation», выбрать строку «Cycling A.FAM/ Green» и нажать клавишу «Show».
В меню окна «Quantitation Analysis» нажать клавишу «Dynamic Tube» и «Slope Correct». Выбрать линейную шкалу отображения результатов нажатием клавиши «Linear Scale». В правой нижней части окна установить значение для пороговой линии «Threshold» таким образом, чтобы пороговая линия проходила примерно в начале роста кинетических кривых на графике.



3. Повторить те же операции для каналов **ROX/ Orange** и **Cy5/ Red**.
4. Сохранить результаты расчета значений пороговых циклов нажатием в меню программы **Files → Save As → Excel Analysis Sheet** на Рабочем столе в папке МБТ\Отчеты\ год.



5. После нажатия кнопки «сохранить» автоматически откроется программа Microsoft Office Excel. В меню программы нажать **Files → Save As** и повторно сохранить файл с расширением **.txt** на Рабочем столе в папке МБТ \Отчеты\ год.

Обработка результатов ПЦР-РВ с помощью шаблона в программе Excel описана в приложении 5.

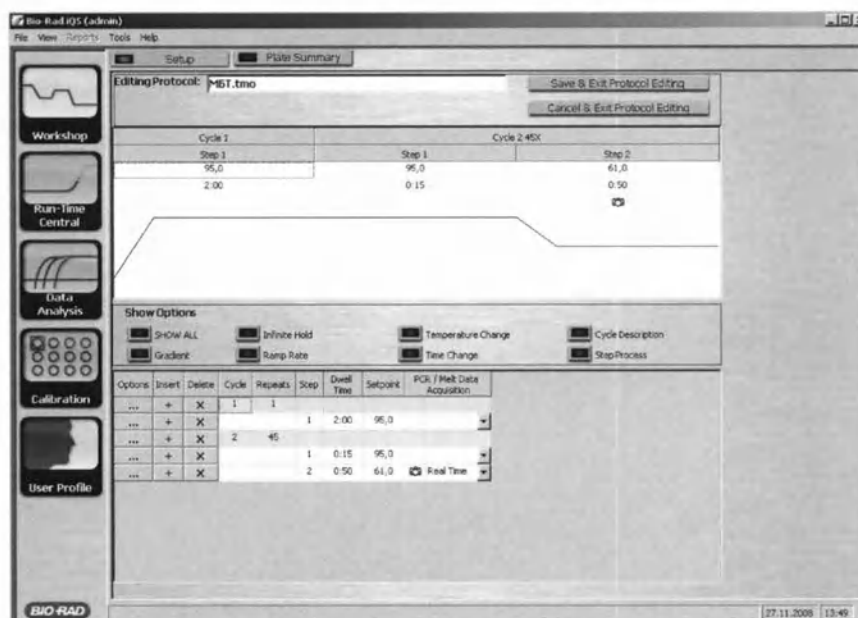
Порядок работы, учета и интерпретации результатов анализа на приборе iQ5 (Bio-Rad США)

Подготовка к работе

В случае первого использования прибора **iCycler iQ** или переустановки программы необходимо создать **новый протокол** – «МБТ».

1. Открыть **программу** для прибора **iCycler iQ**.
2. Выбрать окно **Workshop**, затем **Setup**→**Run Set**.
3. В поле **Selected Protocol** выбрать опцию **Create New**:
4. В появившемся окне задать название протокола и программу амплификации со следующими параметрами:

Cycle (цикл)	Repeats (повторы)	Step (шаг)	Dwell Time (время)	Setpoint (температура)	PCR /Melt Data Acquisition
1	1				
		1	02:00	95,0	
2	45				
		1	00:15	95,0	
		2	00:50	61,0	Real time



5. Нажать **Save&Exit Protocol Editing**, затем ввести имя протокола **МБТ.tmo** и нажать **Сохранить**.
6. В поле **Selected Plate Setup** выбрать опцию **Create New**.
7. В появившемся окне задать следующие параметры:
Sample Volume: 30
Seal Type: Domed Cap
Vessel Type: Tubes
8. Нажать кнопку **Select/ Add Fluorophores**. В появившемся окне **Fluor Selector** выбрать следующий набор красителей: **FAM, HEX, ROX**.



9. Нажать **OK**.

10. В зависимости от выбранного варианта исследования («Калибровка» или «Тест») и в соответствии с инструкцией к прибору задать расположение пробирок в амплификаторе (см. п. «Порядок следования ДНК образцов»). Выделить область – исключая крайние ячейки. Нажать **Spreadsheet**, задать названия образцов. Нажать **Exit Plate Spreadsheet Editing**.

11. Нажать **Save & Exit Plate Editing**. Сохранить.

12. При дальнейшей работе использовать созданный шаблон.

Организация отчетных файлов описана в приложении 5.

Проведение анализа. Варианты «МБТ Калибровка», «МБТ Тест».

Порядок следования образцов при варианте «МБТ Калибровка»

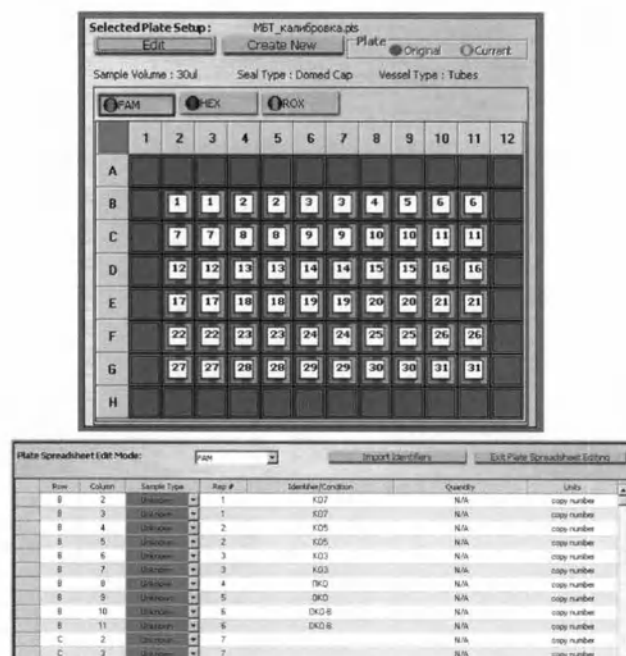
В каждую постановку включают три калибровочных образца (КО) ДНК (в повторе), один положительный контрольный образец ПЦР (ПКО) и один отрицательный контрольный образец ПЦР (ОКО).

Отрицательный контрольный образец выделения (ОКО-В) из каждой партии выделений ДНК анализируют как исследуемый образец.

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

Ячейки В2-В3: два КО 7
 Ячейки В4-В5: два КО 5
 Ячейки В6-В7: два КО 3
 Ячейка В8: один ПКО
 Ячейка В9: один ОКО
 Ячейки В10-В11: два ОКО-В
 Ячейки С2-С5: исследуемые образцы с повтором каждого.

№ ячейки	Образец
В2	КО 7
В3	КО 7
В4	КО 5
В5	КО 5
В6	КО 3
В7	КО 3
В8	ПКО
В9	ОКО
В10	ОКО-В
В11	ОКО-В
С2	исследуемый образец 1
С3	исследуемый образец 1
С4	исследуемый образец 2
С5	исследуемый образец 2
...	...



Порядок следования образцов при варианте «МБТ Тест»

В каждую постановку включают два калибровочных образца (КОЗ), один положительный контрольный образец ПЦР (ПКО) и один отрицательный контрольный образец ПЦР (ОКО).

Отрицательный контрольный образец выделения (ОКО-В) из каждой партии выделений ДНК анализируют как исследуемый образец.

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

- Ячейки В2-В3: два КОЗ
- Ячейка В4: один ПКО
- Ячейка В5: один ОКО
- Ячейки В6-В7: два ОКО-В
- Ячейки В8-Н: исследуемые образцы с повтором каждого.

№ ячейки	Образец
В2	КОЗ
В3	КОЗ
В4	ПКО
В5	ОКО
В6	ОКО-В
В7	ОКО-В
В8	исследуемый образец 1
В9	исследуемый образец 1
В10	исследуемый образец 2
В11	исследуемый образец 2
...	...

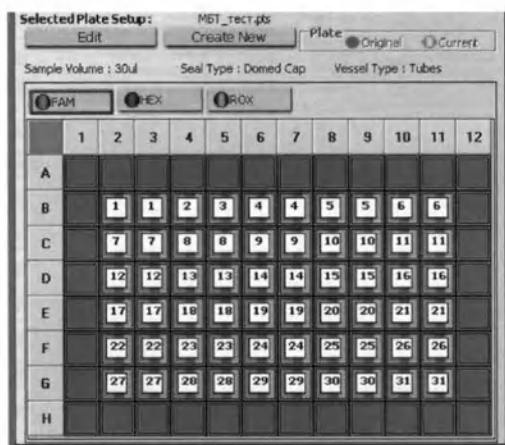
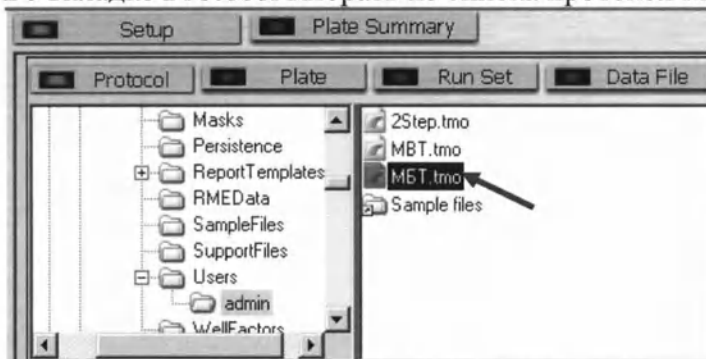


Plate Spreadsheet Edit Mode: FAM Import Identifiers Exit Plate Spreadsheet Editing

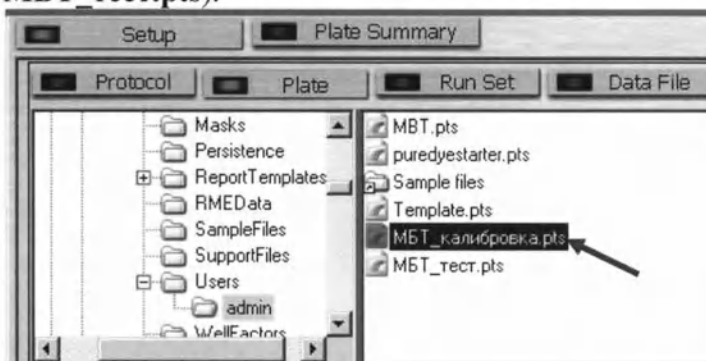
Row	Column	Sample Type	Rep. #	Identifier/Condition	Quantity	Units
B	2	Unknown	1	KD3	N/A	copy number
B	3	Unknown	1	KD3	N/A	copy number
B	4	Unknown	2	PKO	N/A	copy number
B	5	Unknown	3	OKO	N/A	copy number
B	6	Unknown	4	OKO-B	N/A	copy number
B	7	Unknown	4	OKO-B	N/A	copy number
B	8	Unknown	5		N/A	copy number
B	9	Unknown	5		N/A	copy number

Подготовка к проведению ПЦР-РВ описана в основной инструкции.

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Открыть *программу iCycler iQ*.
3. Выбрать окно **Workshop**, затем **Setup**.
4. Во вкладке **Protocol** выбрать из списка протокол **МБТ.tmo**.



5. Во вкладке **Plate** выбрать из списка протокол **МБТ_калибровка.pts** (или **МБТ_тест.pts**).

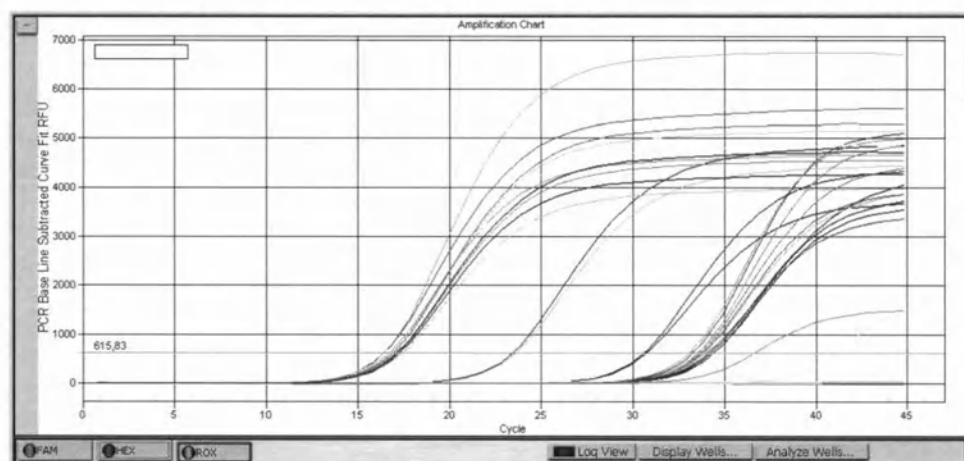
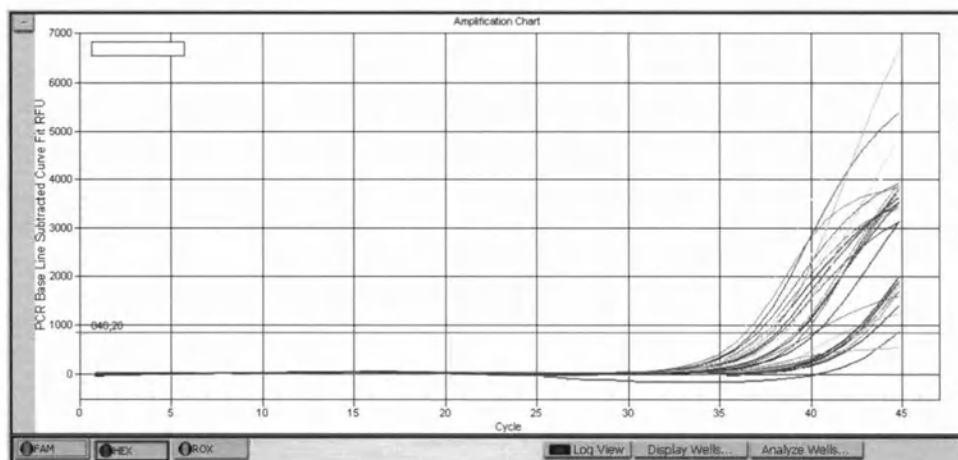
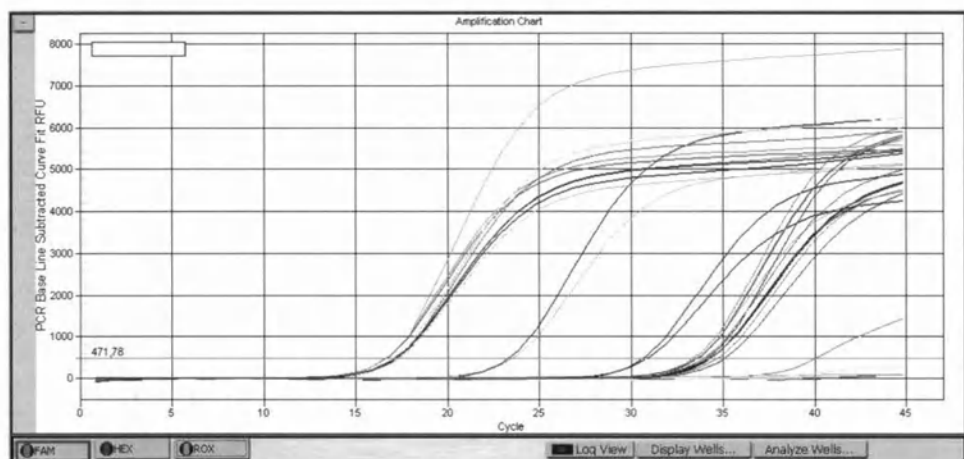


6. В поле **Selected Plate** нажать кнопку **Edit**, затем **Spreadsheet**. В открывшемся окне задать названия исследуемых образцов. Нажать **Exit Plate Spreadsheet Editing**→**Save & Exit Plate Editing**.
7. Начать работу прибора нажатием клавиши **Run** и **Сохранить**.

Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

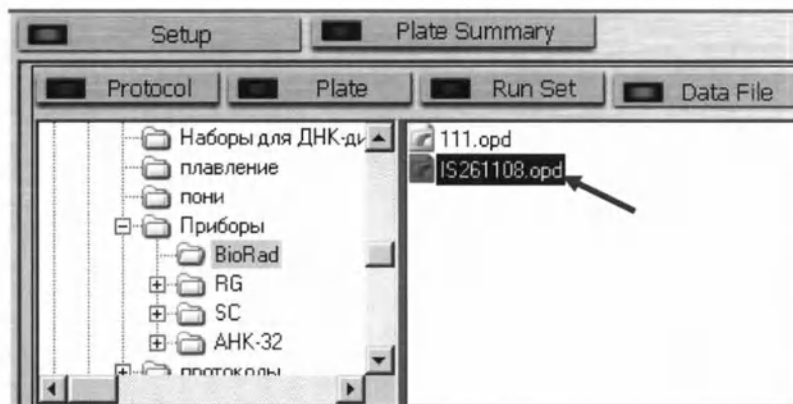
Отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

Примеры кинетических кривых.



Расчет значений порогового цикла

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе **iCycler**. Для этого выбрать **Workshop**→**Setup**→**Data File**.



2. В меню **Data Analysis** выбрать **PCR Quant**. Нажать кнопку **Results** и экспортировать данные в **Excel**.

Обработка результатов ПЦР-РВ с помощью шаблона в программе Excel описана в приложении 5.

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»

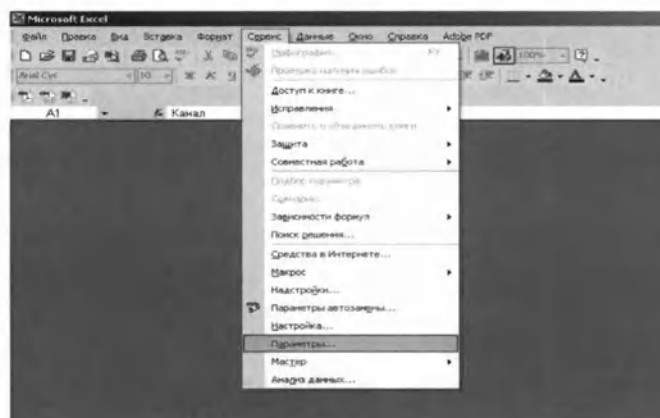
Для обработки результатов реакции необходимо, чтобы на компьютере была установлена программа Microsoft Excel из пакета Microsoft Office.

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

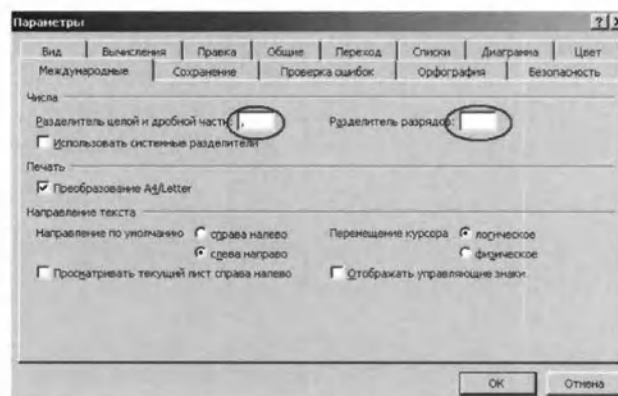
В программе Excel выбрать вкладку «Сервис», затем «Параметры»:



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

Разделитель целой и дробной части « , »

Разделитель разрядов – пробел:



Нажать клавишу «ОК».

Обработка результатов в программе Excel

Вариант «МБТ Калибровка»

1. Открыть шаблон «Количество МБТ - Калибровка». Для этого выбрать **Рабочий стол → МБТ → Шаблоны → Количество МБТ - Калибровка.xlt**. Нажать «Не отключать макросы».
2. Ввести в соответствующие ячейки дату, имя оператора, название исходного файла (в программе «ПЦР»), серийный номер набора.

	A	B	C	D	E	F
1	Тест-система:	"Амплитуб-РВ"				
	Тип анализа:	Качественное и количественное определение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса				
2						
3	Дата:		170308			
4	Оператор:		Авраменко			
5	Файл:		050503-17161907			
6	Серия			050503		

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

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Тест-система:	"Амплитуб-РВ"										
	Тип анализа:	Качественное и количественное определение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса										
2												
3	Дата:		170308									
4	Оператор:		Авраменко									
5	Файл:		050503-17161907									
6	Серия			050503								

4. 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».
5. Для того чтобы распечатать отчет, необходимо перейти на лист с названием «Отчет», нажать «Файл», затем «Печать» и «ОК». Для полного отчета можно распечатать и лист «Результаты»

40	17			
41	18			
42	19			
43	20			
44	21			
45	22			

Import Результаты Отчет

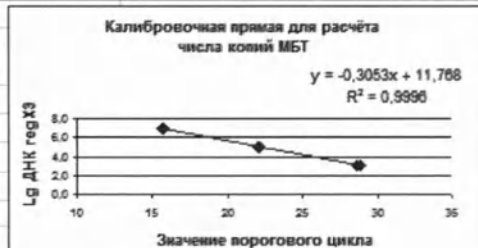
На листе «Отчет»:

- в столбце «**Название**» отражены названия контрольных и исследуемых образцов ;

- в столбце «Наличие МБТ в образце» отражены результаты по обнаружению микобактерий туберкулезного комплекса в контрольных и исследуемых образцах;
- в столбце «Число копий МБТ в образце» отражены результаты количественного определения микобактерий туберкулезного комплекса в исходных образцах;
- в столбце «Выводы» представлены результаты автоматического анализа контрольных и исследуемых образцов;
- в столбце «Действие» представлены результаты автоматического анализа возможных действий.

Пример отчетного файла «Количество МБТ - Калибровка».

Microsoft Excel - Количество МБТ - Калибровка1						
Файл Правка Вид Вставка Формат Сервис Данные Окно Справка						
C6 =Результаты!C6						
	A	B	C	D	H	I
1	Тест-система:	"АмплиТуб-РВ"				
2	Тип анализа:	Обнаружение и определение количества микобактерий туберкулезного комплекса (МБТ)				
3	Дата:	12 апреля 2008 г.				
4	Оператор:	Первый				
5	Файл:	тест				
6	Серия	тест				
7						
8						
9						
10	№	Название	Наличие МБТ в образце	Число копий МБТ в образце	Вывод	Действие
11	7	ПКО2	Да, мало	8,72E+01	Результаты постановки по ПКО достоверны	Анализ завершен
12	8	ОКО	Нет		Результаты постановки по ОКО достоверны	Анализ завершен
13	9	ОКО-В	Нет		Результаты постановки по ОКО-В достоверны	Анализ завершен
14	10	ОКО-В	Нет		Результаты постановки по ОКО-В достоверны	Анализ завершен
15	11	Выше	Да, много	3,01E+08	МБТ обнаружены, количество выше допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен, для достоверного количественного определения необходимо разбавить образец ДНК
16	12	Выше	Да, много	3,23E+08	МБТ обнаружены, количество выше допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен, для достоверного количественного определения необходимо разбавить образец ДНК
17	13	+	Да	3,17E+04	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
18	14	+	Да	3,85E+04	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
19	15	Выше +	Да	9,81E+06	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
20	16	Выше +	Да	1,01E+07	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
21	17	ниже	Да, мало	8,72E+02	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
22	18	ниже	Да, мало	1,13E+03	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
23	19	око-в	Да, мало	1,23E+01	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
24	20	око-в	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
25	21	ниже -	Да ?		МБТ обнаружены, высокий риск контаминации	Рекомендуется повторить исследование.
26	22	ниже -	Да ?		МБТ обнаружены, высокий риск контаминации	Рекомендуется повторить исследование.
27	23	ниже ниже	Да, мало	1,23E+01	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
28	24	ниже ниже	Да, мало	7,99E+00	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
29	25	--	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
30	26	--	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
31	27	-- мало	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, выделение не эффективно
32	28	-- мало	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, выделение не эффективно
33	29	-- нет	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР
34	30	-- нет	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР
35	31		???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР
36	32		???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР



Вариант «МБТ Тест»

1. Открыть шаблон «Количество МБТ - Тест». Для этого выбрать **Рабочий стол → МБТ → Шаблоны → Количество МБТ - Тест.xlt**. Нажать «Не отключать макросы».
2. Ввести в соответствующие ячейки дату, имя оператора, название исходного файла (в программе «ПЦР»), серийный номер набора.

	A	B	C	D	E	F
1	Тест-система:		"Амплитуб-РВ"			
2	Тип анализа:		Качественное и количественное определение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса			
3	Дата:		170308			
4	Оператор:		Авраменко			
5	Файл:		050503-17161907			
6	Серия		050503			

3. Импортировать в шаблон параметры калибровочных прямых из файла с калибровками для данной серии набора реагентов. Для этого открыть файл с калибровкой, скопировать содержимое **голубого прямоугольника** на листе **Результаты** и вставить, используя режим **Специальная вставка**, значения в голубой прямоугольник текущего файла.
4. Импортировать в шаблон рассчитанные значения пороговых циклов. Для этого нажать клавишу «Импорт данных», выбрать папку **Рабочий стол → МБТ → Отчеты → Год → Месяц → «название_файла.данные»**. Нажать «Открыть» и «Готово».

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Тест-система:		"Амплитуб-РВ"									
2	Тип анализа:		Качественное и количественное определение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса									
3	Дата:		170308									
4	Оператор:		Авраменко									
5	Файл:		050503-17161907									
6	Серия			050503								

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».

Для того чтобы распечатать отчет, необходимо перейти на лист с названием «Отчет», нажать «Файл», затем «Печать» и «ОК». Для полного отчета можно распечатать и лист «Результаты»

40	1/			
41	18			
42	19			
43	20			
44	21			
45	22			

На листе «Отчет»:

- в столбце «**Название**» отражены названия контрольных и исследуемых образцов ;
- в столбце «**Наличие МБТ в образце**» отражены результаты по обнаружению микобактерий туберкулезного комплекса в контрольных и исследуемых образцах;

- в столбце «**Число копий МБТ в образце**» отражены результаты количественного определения микобактерий туберкулезного комплекса в исходных образцах;
- в столбце «**Выводы**» представлены результаты автоматического анализа контрольных и исследуемых образцов;
- в столбце «**Действие**» представлены результаты автоматического анализа возможных действий.

Пример отчетного файла «Количество МБТ - Тест»

Microsoft Excel - Количество МБТ1						
Файл Правка Вид Вставка Формат Сервис Данные Окно Справка						
100% Arial Cyr						
C1 "АмплиТуб-РВ"						
	A	B	C	D	H	I
1	Тест-система:		"АмплиТуб-РВ"			
2	Тип анализа:		Обнаружение и определение количества микобактерий туберкулезного комплекса (МБТ)			
3	Дата:		15 апреля 2008 г.		Серия:	тест
4	Оператор:		тест		Калибровочный файл:	Комплект МБТ -Калибровка 1
5	Файл:		тест			
6	№	Название	Наличие МБТ в образце	Число копий МБТ в образце	Вывод	Действие
7	1	КОЗ	Да	1,05E+03	Результаты постановки по КОЗ достоверны	Анализ завершен
8	2	КОЗ	Да	8,97E+02	Результаты постановки по КОЗ достоверны	Анализ завершен
9	3	ПКО2	Да	9,93E+01	Результаты постановки по ПКО достоверны	Анализ завершен
10	4	ОКО	Нет		Результаты постановки по ОКО достоверны	Анализ завершен
11	5	ОКО-в	Нет		Результаты постановки по ОКО-В достоверны	Анализ завершен
12	6	ОКО-в	Нет		Результаты постановки по ОКО-В достоверны	Анализ завершен
13	7	1	Да, мало	9,93E+02	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
14	8	2	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
15	9	3	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
16	10	ОКО-в	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
17	11	Выше	Да, много	2,86E+08	МБТ обнаружены, количество выше допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен, для достоверного количественного определения необходимо разбавить образец ДНК
18	12	Выше	Да, много	3,07E+08	МБТ обнаружены, количество выше допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен, для достоверного количественного определения необходимо разбавить образец ДНК
19	13	+	Да	3,43E+04	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
20	14	+	Да	4,15E+04	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
21	15	Выше +	Да	9,79E+06	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
22	16	Выше +	Да	1,01E+07	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
23	17	ниже	Да, мало	9,93E+02	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
24	18	ниже	Да, мало	1,28E+03	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
25	19	око-в	Да, мало	1,48E+01	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
26	20	око-в	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
27	21	ниже -	Да ?		МБТ обнаружены, высокий риск контаминации	Рекомендуется повторить исследование.
28	22	ниже -	Да ?		МБТ обнаружены, высокий риск контаминации	Рекомендуется повторить исследование.
29	23	ниже ниже	Да, мало	1,48E+01	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
30	24	ниже ниже	Да, мало	9,72E+00	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела количественного измерения	Анализ завершен с недостоверной количественной оценкой
31	25	--	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
32	26	--	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
33	27	-- мало	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, выделение не эффективно
34	28	-- мало	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, выделение не эффективно
35	29	-- нет	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР
36	30	-- нет	???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР
37	31		???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР
38	32		???		Недостоверный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при автоматическом анализе с использованием шаблона для автоматической обработки результатов анализа проводится с соответствии с таблицей:

Результат ПЦР			Наличие МБТ в образце	Число копий в образце	Вывод	Действия
IS6110	regX	ВПК				
+	+	любое	Да	<1,0 E+08 >1,0 E+04	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
Выше	Выше	любое	Да, много	>1,0 E+08	МБТ обнаружены, количество выше допустимого предела измерения	Анализ завершен, для более точного количественного определения необходимо разбавить образец
+	Ниже	любое	Да, мало	<1,0 E+04	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела измерения	Анализ завершен, для более точного количественного определения необходимо повторить ПЦР
Выше	+	любое	Да	<1,0 E+08 >1,0 E+04	МБТ обнаружены, количество в пределах диапазона измерения	Анализ завершен
Ниже	-	+	Да?		МБТ обнаружены, определить количество невозможно	Рекомендуется повторить исследование, высокий риск контаминации.
-	Ниже	+	Да?	<1,0 E+04	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела измерения	Рекомендуется повторить исследование, высокий риск контаминации.
Ниже	-	Мало Нет ВПК	Да?		МБТ обнаружены, определить количество невозможно	Рекомендуется повторить исследование, ингибирование
Ниже	Ниже	любое	Да, мало	<1,0 E+04	МБТ обнаружены, количество ниже допустимого предела измерения	Анализ завершен, для повышения надежности результата необходимо повторить исследование
-	-	+	Нет		МБТ не обнаружены	Анализ завершен
-	-	Нет ВПК	???		Ложноотрицательный результат	Повторить исследование, ингибирование ПЦР
-	-	Мало ВПК	???		Недостовверный результат	Повторить исследование, выделение ДНК прошло не достаточно эффективно

Всего прошнуровано,
пронумеровано и
скреплено печатью
55 листов (пятидесять
пять).



ГЕНЕРАЛЬНЫЙ
ДИРЕКТОР
КУЗУБОВ А. В.

Shub