



«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной Службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития

Р.У. Хабриев

2006 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА
И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К ФТОРХИНОЛОНАМ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ
С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ ИЗОБРАЖЕНИЕМ
НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ
(ТБ-БИОЧИП®-2)**

Рекомендована к утверждению
Научно-экспертным Советом
по медицинским изделиям

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов ТБ-БИОЧИП-2 предназначен для выявления возбудителя туберкулеза в образцах мокроты человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и определения его лекарственной чувствительности к химиопрепаратам второго ряда – фторхинолонам - методом гибридизации на биологическом микрочипе.

1.2. Фторхинолоны представляют собой противотуберкулезные химиопрепараты второго ряда. Установлено, что устойчивость возбудителя туберкулеза к этим химиопрепаратам может быть определена на генетическом уровне - по молекулярно-генетическим маркерам резистентности. В данном случае такими маркерами являются определенные мутации в гене *gyrA*. Преимущество определения устойчивости к химиопрепаратам на генетическом уровне заключается не только в экспрессности получения результатов, но и в возможности точного обнаружения типа мутации, приводящей к устойчивости. Набор реагентов ТБ-БИОЧИП-2 предназначен для выявления точного типа мутации, приводящей к устойчивости возбудителя туберкулеза к фторхинолонам.

1.3. Набор рассчитан на проведение 100 анализов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы (их количество зависит от количества анализируемых одновременно исследуемых образцов).

Инструкция составлена: научн. сотр., канд. биол. наук С.А. Лапой, научн. сотр., канд. биол. наук Д.А. Грядновым, зам. директора, проф. А.С. Заседателевым - сотрудниками ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН; руководителем лаборатории молекулярно-генетических исследований ГУ ЦНИИТ РАМН, проф. Л.Н. Черноусовой.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА.

2.1. Набор реагентов ТБ-БИОЧИП-2 основан на применении двух стадий ПЦР и последующей гибридизации полученного ПЦР-продукта на биологическом микрочипе.

2.2. Первая стадия ПЦР с использованием высокоспецифичных праймеров применяется для выявления Микобактерий туберкулеза в исследуемом образце (мокрота).

2.3. Вторая стадия ПЦР с использованием флуоресцентно-меченных праймеров применяется для получения ПЦР-продукта, содержащего флуоресцентную метку – для последующей визуализации результатов гибридизации на биологическом микрочипе.

2.4. Гибридизация на биологическом микрочипе осуществляется для выявления мутаций, приводящих к устойчивости Микобактерий туберкулеза к фторхинолонам. Гибридизация проводится с продуктом второй стадии ПЦР. Биологический микрочип представляет собой подложку с иммобилизованными зондами, специфичными к основным типам мутаций в гене *rpoB*. Визуализация результатов гибридизации проводится с помощью возбуждения флуоресценции после реакции меченого ПЦР-продукта второй стадии с зондами, иммобилизованными на биологическом микрочипе. Интерпретация результатов осуществляется программно (полуавтоматически) в зависимости от того, с какими из иммобилизованных зондов прошла реакция гибридизации.

3. СОСТАВ НАБОРА.

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

а) комплект № 1 для выделения ДНК Микобактерий туберкулеза из мокроты, включающий:

- Деконт-А (реагент А для деконтаминации образцов) – 10 пробирок (по 0,25 г);
- Деконт-Б (реагент Б для деконтаминации образцов) – 10 пробирок (по 1,0 г);
- ПБ-1 (промывочный буфер 1) – 3 флакона (по 25 мл);
- ПБ-2 (промывочный буфер 2) – 1 флакон (20 мл);
- ЛБ (лизирующий буфер) – 1 флакон (10 мл).

б) комплект № 2 для проведения ПЦР, включающий:

- ПЦР-буф (10-кратный буфер для ПЦР) – 1 пробирка (1,5 мл);
- дНТФ (водный раствор трифосфатов) – 1 пробирка (1,4 мл);
- ПР-1(ТБ-2) (водный раствор праймеров для проведения первой стадии ПЦР) – 1 пробирка (0,12 мл);
- ПР-2(ТБ-2) (водный раствор праймеров для проведения второй стадии ПЦР) – 1 пробирка (0,12 мл);

- UDG (урацил-N-гликозилазу) – 1 пробирка (0,04 мл)
- Taq (Taq-полимеразу) – 1 пробирка (0,2 мл);
- К+ (положительный контрольный образец ДНК) – 1 пробирка (0,1 мл);
- К- (отрицательный контрольный образец) – 1 пробирка (1,5 мл);
- ВМ (масло вазелиновое) – 1 флакон (10 мл);
- MQ (воду деионизованную для проведения ПЦР) – 1 флакон (10 мл).

в) комплект № 3 для проведения электрофореза, включающий:

- ЭтидБром (раствор бромида этидия) – 1 пробирка (0,02 мл);
- ЭБ-1 (50-кратный буфер для проведения электрофореза) – 1 флакон (20 мл);
- Агарозу (агарозу для проведения электрофореза) – 10 пробирок (по 0,7 г);
- ЭБ-2 (10-кратный буфер для нанесения образца) – 1 пробирка (0,24 мл);
- Ladder (молекулярный ДНК-маркер) – 1 пробирка (0,02 мл).

г) комплект № 4 для проведения гибридизации на микрочипе, включающий:

- ГБ (буфер для гибридизации) – 2 пробирки (по 2,0 мл);
- ПБ-3 (промывающий буфер 3) – 1 флакон (30 мл).

д) комплект № 5, включающий биологические микрочипы, каждый из которых

рассчитан на проведение одного определения чувствительности Микобактерий туберкулеза к фторхинолонам – 100 штук.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Набор специфично выявляет ДНК Микобактерий туберкулеза в исследуемом образце (мокрота) и определяет наличие/отсутствие устойчивости к фторхинолонам.

4.2. Чувствительность. Набор способен выявлять Микобактерии туберкулеза при наличии не менее 100 геном-эквивалентов ДНК Микобактерий туберкулеза в 3 мкл образца после обработки комплектом №1 (для проведения первой стадии ПЦР берется 3 мкл образца).

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях нетоксичны.

5.3. При работе с набором необходимо соблюдать требования "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г).

5.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы мокроты человека могут содержать возбудители различных инфекций.

5.5. По окончании анализа использованные пробирки и флаконы необходимо продезинфицировать водным раствором монохлорамина Б (4%).

5.6. При работе с включенным трансиллюминатором следует пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги кожи лица и слизистой глаз.

5.7. Запрещается снимать крышку с электрофорезной камеры, если она подключена к источнику питания, так как высокое напряжение опасно для жизни.

5.8. С агарозным гелем следует работать в перчатках, поскольку при его приготовлении используется бромистый этидий, который является сильным мутагеном.

5.9. Выявление ДНК Микобактерий туберкулеза методом ПЦР должно проводиться в трех отдельных помещениях (зонах).

5.10. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

5.11. Все работы с мокротой, выделенной ДНК и реагентами для проведения ПЦР должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников для полуавтоматических пипеток.

5.12. Перемещение персонала из комнаты для электрофореза в другие помещения должны проходить под строгим контролем. Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при переходе из помещения для электрофореза.

5.13. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

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

5.15. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Комплекс универсальный аппаратно-программный (УАПК) для анализа биочипов;
- ДНК-амплификатор автоматический;
- трансиллюминатор ультрафиолетовый;
- прибор для горизонтального электрофореза;
- центрифуга для микропробирок, позволяющая развивать ускорение 10000 g;
- холодильник бытовой;
- встряхиватель вихревой для микропробирок (вортекс);
- термостат суховоздушный закрытый, поддерживающий температуру +37 °С;
- термостат суховоздушный для микроцентрифужных пробирок вместимостью 500 и 1500 мкл, поддерживающий температуру +95 °С;
- прибор для горизонтального электрофореза;
- плитка электрическая, поддерживающая температуру +150 °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие забирать объемы жидкости 2, 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл;
- колбы мерные вместимостью 50 и 1000 мл;
- стакан термостойкий вместимостью 200 мл;
- планшет полистироловый 96-луночный;
- пробирки пластиковые стерильные вместимостью 500 и 1500 мкл с крышками;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

7.1. Приготовление смеси для обработки мокроты.

Содержимое одной пробирки Деконт-Б следует предварительно растворить в 50 мл дистиллированной воды и количественно перенести туда содержимое одной пробирки Деконт-А. Тщательно перемешать до полного растворения. Полученной смеси достаточно для обработки 10 образцов.

Приготовленная смесь должна быть использована в течение времени не более 8 ч.

7.2. Приготовление промывающего раствора ПБ-1.

Перенести количественно содержимое флакона ПБ-1 в мерную колбу вместимостью 1000 мл, довести объем дистиллированной водой до 1000 мл и тщательно перемешать.

Приготовленный раствор допускается хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Обработка мокроты и выделение ДНК (комплект № 1).

8.1.1. К 2-5 мл анализируемого образца добавить равный объем (2-5 мл) смеси для обработки мокроты (см п. 7.1). Перемешать на вортексе в течение 15-20 с.

8.1.2. Смесь инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре (+18-25 °С), периодически помешивая.

8.1.3. После окончания инкубации добавить к смеси 5 объемов ПБ-1 (20-50 мл) и перемешать на вортексе в течение 15-20 с.

8.1.4. Центрифугировать в течение 30 мин при 3000 g при комнатной температуре, надосадочную жидкость удалить.

8.1.5. Оставшуюся суспензию клеток (200-500 мкл) перенести в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 1500 мкл. Для этого использовать отдельную

полуавтоматическую пипетку, рассчитанную на объем 1000 мкл, и одноразовый наконечник с фильтром.

8.1.6. Добавить к суспензии клеток 1 объем промывающего буфера ПБ-1 и перемешать смесь на вортексе в течение 10 с.

8.1.7. Центрифугировать в течение 10 мин при 10000 g при комнатной температуре (+18-25 °C), надосадочную жидкость удалить.

8.1.8. Добавить к осадку 100 мкл буфера ПБ-2 и перемешать на вортексе в течение 10 с.

8.1.9. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 10000 g при комнатной температуре, надосадочную жидкость удалить.

8.1.10. Повторить пункты 8.1.8-8.1.9.

8.1.11. Добавить к осадку 30 мкл лизирующего буфера ЛБ. Смесь перемешать на вортексе в течение 10 с.

8.1.12. Прогреть пробирку в термостате в течение 15 мин при температуре +95 °C, после чего охладить пробирку, поместив ее на лед на 5-10 мин.

8.1.13. Центрифугировать в течение 10 мин при 10000 g при комнатной температуре. Для проведения ПЦР использовать надосадочную жидкость. Допускается хранение полученного продукта при температуре -20 °C не более 1 мес.

8.2. Приготовление смеси для амплификации и постановка I этапа ПЦР (комплект № 2).

8.2.1. Приготовить пробирки вместимостью 500 мкл для проведения I этапа ПЦР, пронумеровать и расположить их в штативе соответствующим образом – «К+», «К-» и исследуемые образцы после обработки мокроты и выделения ДНК.

8.2.2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР (комплект № 2). В стерильную пробирку для приготовления реакционной смеси вместимостью 500-1500 мкл в зависимости от числа анализируемых образцов N (включая «К+» и «К-») внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

Вода денонизованная	19,7 x (N+1) мкл
ПЦР-буф	3,0 x (N+1) мкл
дНТФ	3,0 x (N+1) мкл
PR-1(ТБ-2)	0,6 x (N+1) мкл
UDG	0,3 x (N+1) мкл
Taq _____	0,4 x (N+1) мкл
Общий объем	27 x (N+1) мкл

8.2.3. Тщательно перемешать полученную реакционную смесь и внести по 27 мкл в пробирки, подготовленные для проведения ПЦР. Если используется амплификатор без подогрева крышки, в каждую пробирку внести по 30 мкл вазелинового масла ВМ для предохранения реакционной смеси от испарения при амплификации.

8.2.4. Внести аликвоту (3 мкл) анализируемых образцов (см п. 8.1.13), а также «К+» и «К-» в пробирки с реакционной смесью. Удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 с при 1000 g.

8.2.5. Поместить пробирки в автоматический ДНК-амплификатор и провести амплификацию по следующей программе (см таблицу 1).

Таблица 1. Температурно-временной профиль 1-го этапа ПЦР.

Шаг программы	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
1	+95 (предварительная денатурация ДНК)	4 мин	1
2	+95 (денатурация ДНК)	30 с	36
	+67 (отжиг праймеров)	30 с	
	+72 (удлинение праймеров)	30 с	
3	+72 (завершающая инкубация)	5 мин	1

8.3. Проведение электрофореза после I этапа ПЦР (комплект № 3).

8.3.1. Подготовка к проведению электрофореза.

8.3.1.1. Приготовление буфера для проведения электрофореза.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл перенести содержимое флакона ЭБ-1, довести объем до 1000 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

8.3.1.2. Приготовление электрофорезного геля.

8.3.1.2.1. Перенести содержимое пробирки Агароза в термостойкий стакан и довести объем до 35 мл дистиллированной водой. Полученную взвесь кипятить до полного исчезновения конгломератов нерасплавившейся агарозы, которое контролируется визуально.

8.3.1.2.2. Охладить расплав до температуры +45-55 °С и добавить 1,7 мкл раствора ЭтидБром.

8.3.1.2.3. Тщательно перемешать расплав и залить в форму для электрофорезного геля с гребенкой для образования лунок. Дальнейшие операции с гелем проводить только после его остывания при комнатной температуре (+18-25 °С).

8.3.2. Проведение электрофореза.

8.3.2.1. Заполнить электрофорезную камеру буфером для проведения электрофореза.

8.3.2.2. Извлечь электрофорезный гель из формы (см п. 8.3.1.2.3) и поместить его в электрофорезную камеру.

8.3.2.3. В отдельные лунки 96-луночного планшета перенести из ПЦР-пробирок по 9 мкл К+ и К-, а также исследуемых образцов, и добавить к ним по 1 мкл ЭБ-2. В отдельную лунку поместить 2 мкл молекулярного маркера Ladder, добавить к нему 7 мкл дистиллированной воды и 1 мкл ЭБ-2.

8.3.2.4. Приготовленные смеси перемешать и перенести по 8 мкл в отдельные лунки электрофорезного геля.

8.3.2.5. Провести электрофорез при 10 В/см в течение 10 мин.

8.3.2.6. Выключить прибор для проведения электрофореза и извлечь из него электрофорезный гель.

8.3.2.7. Просмотреть гель в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. При необходимости полученные результаты можно документировать с помощью пленочного или цифрового фотоаппарата с оранжевым светофильтром, либо используя специализированную систему гель-документации.

8.4. Учет результатов I этапа ПЦР.

8.4.1. Проверка отрицательного контроля.

В дорожке, содержащей отрицательный контроль «К-», светящиеся полосы должны отсутствовать. Если в отрицательном контроле присутствует одна или несколько светящихся полос, это свидетельствует о контаминации раствора/ов продуктами амплификации или ДНК положительного контроля. При наличии светящихся полос в отрицательном контроле результаты ПЦР признаются недействительными.

8.4.2. Проверка положительного контроля.

В дорожке с положительным контролем «К+» должны выявляться две полосы следующего размера: 309 п.н. (IS6110) и 234 п.н. (*gyrA*). Если в положительном контроле отсутствуют светящиеся полосы, то такой результат свидетельствует о том, что реакция не прошла. Это может быть вызвано потерей активности фермента, либо тем, что не добавлен один из компонентов реакции, либо произошел сбой в работе амплификатора (неисправность прибора, неверно задана программа, произошло кратковременное отключение питания прибора и т.п.). При отсутствии вышеуказанных полос в положительном контроле результаты ПЦР признаются недействительными.

8.4.3. Учет результатов анализа образцов.

В дорожках с исследуемыми образцами ДНК Микобактерий туберкулеза должны выявляться две полосы следующего размера: 309 п.н. (IS6110) и 234 п.н. (*gyrA*). Наличие амплифицированного

фрагмента ДНК в виде светящейся полосы в дорожке с исследуемым образцом мокроты, соответствующей 309 п.н., свидетельствует о присутствии в образце ДНК Микобактерий туберкулеза. Если данная полоса не выявляется, то считается, что в данном образце Микобактерии туберкулеза отсутствуют, при этом II этап ПЦР и гибридизация на чипе не проводятся.

8.4.4. Для определения лекарственной чувствительности Микобактерий туберкулеза к фторхинолонам необходимо проведение II этапа ПЦР. Для проведения II этапа ПЦР используются лишь те образцы, в которых была выявлена ДНК Микобактерий туберкулеза на I этапе ПЦР.

8.5. Проведение II этапа ПЦР (комплект № 2).

8.5.1. Приготовить пробирки вместимостью 500 мкл для проведения II этапа ПЦР, пронумеровать и расположить их в штативе соответствующим образом – «К+», «К-» и исследуемые образцы после проведения I этапа ПЦР. Реакционную смесь, полученную на I этапе амплификации, используют в качестве матрицы на II этапе реакции амплификации с праймерами для проведения второй стадии ПЦР. В качестве отрицательного контроля используют «К-» из комплекта №2 набора реагентов.»

8.5.2. Приготовить реакционную смесь для проведения II этапа ПЦР (комплект № 2). В стерильную пробирку для приготовления реакционной смеси вместимостью 500-1500 мкл в зависимости от числа анализируемых образцов N (включая «К+» и «К-») внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количества:

Вода деионизованная	37,4 x (N+1) мкл
ПЦР-буф	5,0 x (N+1) мкл
дНТФ	5,0 x (N+1) мкл
PR-2(ТБ-2)	1,0 x (N+1) мкл
Taq	0,6 x (N+1) мкл
Общий объем	49 x (N+1) мкл

8.5.3. Тщательно перемешать смесь и внести по 49 мкл в пробирки, подготовленные для проведения ПЦР.

8.5.4. Если используется амплификатор без подогрева крышки, в каждую пробирку внести по 50 мкл вазелинового масла ВМ для предохранения реакционной смеси от испарения при амплификации.

8.5.5. Отобрать по 1 мкл амплификационной смеси из каждой пробирки после I этапа ПЦР и внести в пробирки со смесью для проведения II этапа ПЦР. Удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10 с при 1000 g.

8.5.6. Поместить пробирки в амплификатор и провести ПЦР по следующей программе (см таблицу 2).

Таблица 2. Температурно-временной профиль 2-го этапа ПЦР.

Шаг программы	Температура, °С	Время выдержки	Количество циклов
1	+95 (предварительная денатурация)	5 мин	1
2	+95 (денатурация)	20 с	37
	+65 (отжиг праймеров)	30 с	
	+72 (удлинение праймеров)	20 с	
3	+72 (окончательная инкубация)	5 мин	1

8.6. Проведение электрофореза после II этапа ПЦР (комплект № 3).

Проводится так, как это указано в п. 8.3.

8.7. Учет результатов II этапа ПЦР.

8.7.1. Проверка отрицательного контроля.

В дорожке с отрицательным контролем «К-» светящиеся полосы должны отсутствовать. При наличии светящихся полос в отрицательном контроле результаты ПЦР признаются недействительными.

8.7.2. Проверка положительного контроля.

В дорожке с положительным контролем должен наблюдаться набор полос с длинами в интервале от 97 до 309 п.н. Возможно наличие полос, визуальное соответствующих ПЦР-продуктам меньшей длины из-за образования одноцепочечных продуктов.

8.7.3. Учет результатов анализа образцов.

В дорожке с исследуемым образцом должен наблюдаться набор полос с длинами в интервале от 97 до 309 н.п. Возможно наличие полос, визуально соответствующих ПЦР-продуктам меньшей длины из-за образования одноцепочечных продуктов. В случае отсутствия вышеуказанных полос результаты ПЦР считаются недействительными.

8.8. Проведение гибридизации (комплекты №№ 4 и 5)

8.8.1. Перенести 12 мкл реакционной смеси после второй стадии ПЦР в пробирку вместимостью 500 мкл. Если при амплификации использовалось вазелиновое масло ВМ, следует избегать его попадания в наконечник пипетки.

8.8.2. Добавить 24 мкл раствора ГБ и перемешать на вихре в течение 5 с.

8.8.3. Нанести на микрочип 28 мкл полученной смеси через любое из двух отверстий его гибридизационной камеры, после чего оба отверстия в крышке камеры заклеймить герметизирующей лентой. При заполнении следует избегать образования воздушных пузырей внутри камеры.

8.8.4. Провести гибридизацию в закрытом суховоздушном термостате при температуре +37 °С в течение 14-18 ч.

8.8.5. По окончании гибридизации удалить гибридизационную камеру, используя специальный клапан сбоку камеры. Нанести 100 мкл буфера ПБ-3 на поверхность микрочипа и инкубировать 10 с при комнатной температуре (+18-25 °С). Удалить буфер с поверхности микрочипа и повторить операцию промывки один раз, после чего быстро ополоснуть микрочип дистиллированной водой для предотвращения образования солевых разводов.

8.8.6. Высушить микрочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки.

8.9. Учет результатов гибридизации.

8.9.1. Результаты гибридизации регистрируют с помощью Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биочипов ТУ 9443-004-02699501-2006. Установка и эксплуатация Комплекса осуществляются в соответствии с Инструкцией по пользованию комплексом УАПК.

8.9.2. Произвести запуск программы «ТубАнализ», которая поставляется вместе с комплексом. При запуске на экране компьютера должна появиться схема микрочипа с указанием отдельных ячеек и обозначением находящихся в них зондов. Названия зондов соответствуют детектируемым мутациям (Рис. 1).

8.9.3. Биологический микрочип после проведения гибридизации, удаления гибридизационной камеры, ополаскивания и высушивания поместить в держатель УАПК так, чтобы активная область, содержащая ячейки геля, оказалась сверху и была ориентированной под оптическую ось прибора (этому соответствует положение «активная область – вглубь УАПК»).

8.9.4. Установить экспозицию в миллисекундах (мс) в диалоговом окне в правой части экрана программы, предварительно переключившись на закладку «Снимок» (выбирается в пределах 10–10000 мс). В случае пере- или недозаэкспозиции программа выдает предупреждение о необходимости уменьшения/увеличения выдержки.

8.9.5. Нажать курсором мыши пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части экрана. При этом происходит освещение ячеек микрочипа светом возбуждающих лазеров, автоматический захват изображения и автоматический вывод результата. В случае, если обнаружена чувствительная к фторхинолонам форма туберкулеза, программа выдает сообщение «Штамм чувствителен к фторхинолонам». В случае, если обнаружена устойчивая к фторхинолонам форма туберкулеза, программа выдает сообщение «Штамм устойчив к фторхинолонам».

8.9.6. Оператор может визуально проконтролировать флуоресцентное изображение на биологическом микрочипе. Для этого после завершения процедуры автоматической интерпретации результатов (см п. 8.9.5) следует переключиться на закладку «Снимок» в правой части экрана и визуально проконтролировать автоматическое наложение сетки на изображения ячеек микрочипа (Рис. 2). В случае некорректного наложения сетки следует «протаскать» мышкой левый и правый нижние элементы сетки до соответствующих ячеек микрочипа. Сетка

должна полностью наложиться на изображение микрочипа. После этого следует переключиться на закладку «Отчет» и снова проверить выдаваемые программой результаты (Рис. 3).

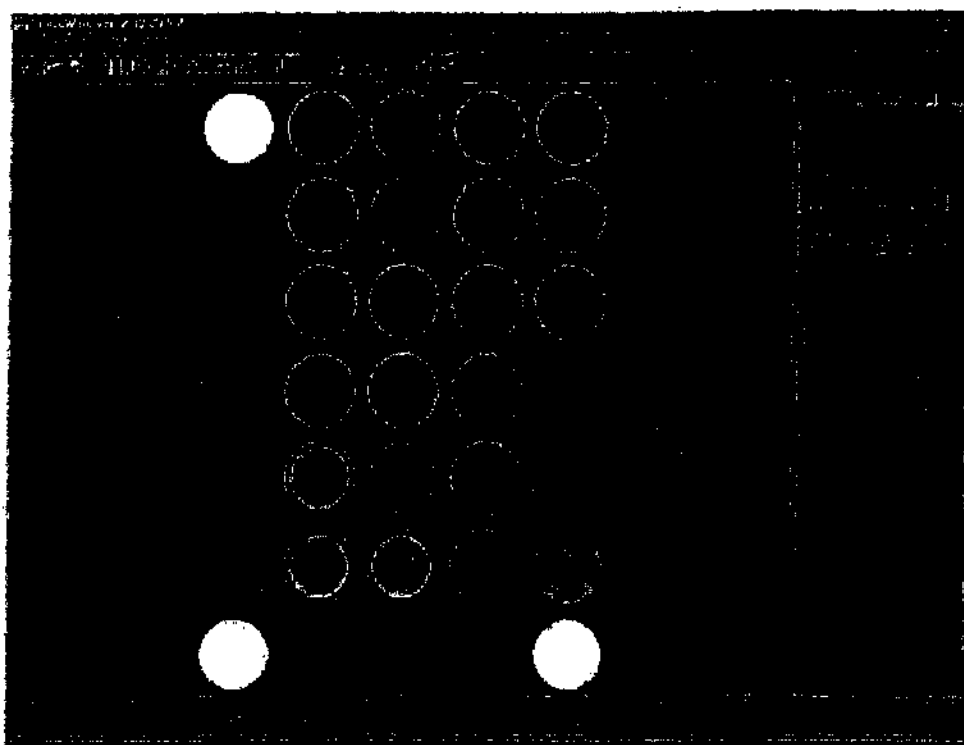


Рис. 1. Диалоговое окно режима 'Шаблон'.

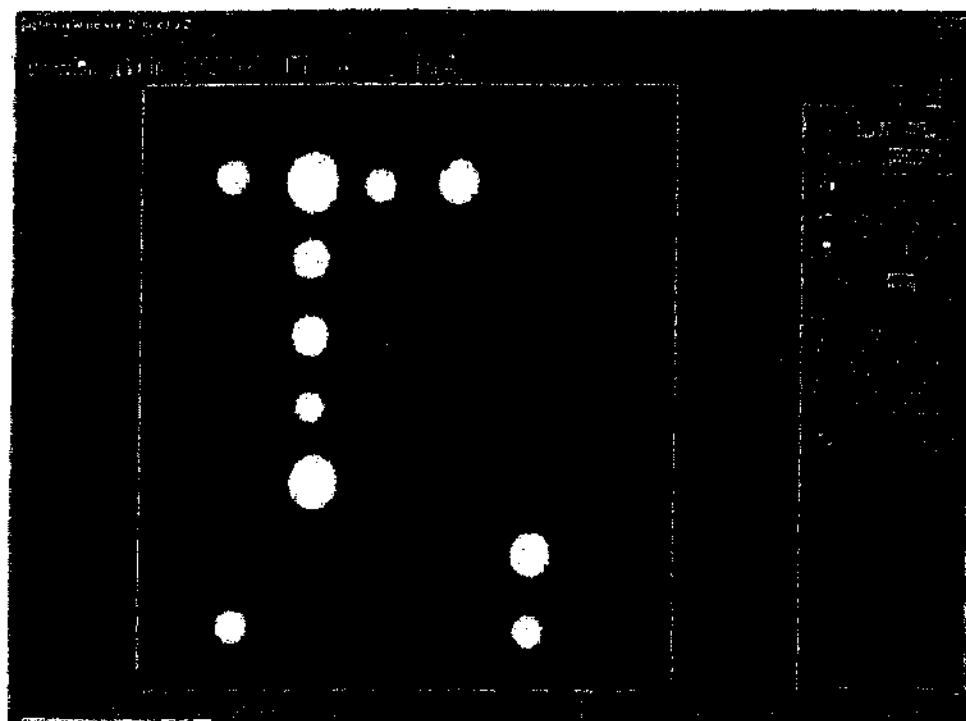


Рис. 2. Диалоговое окно режима 'Снимок'.

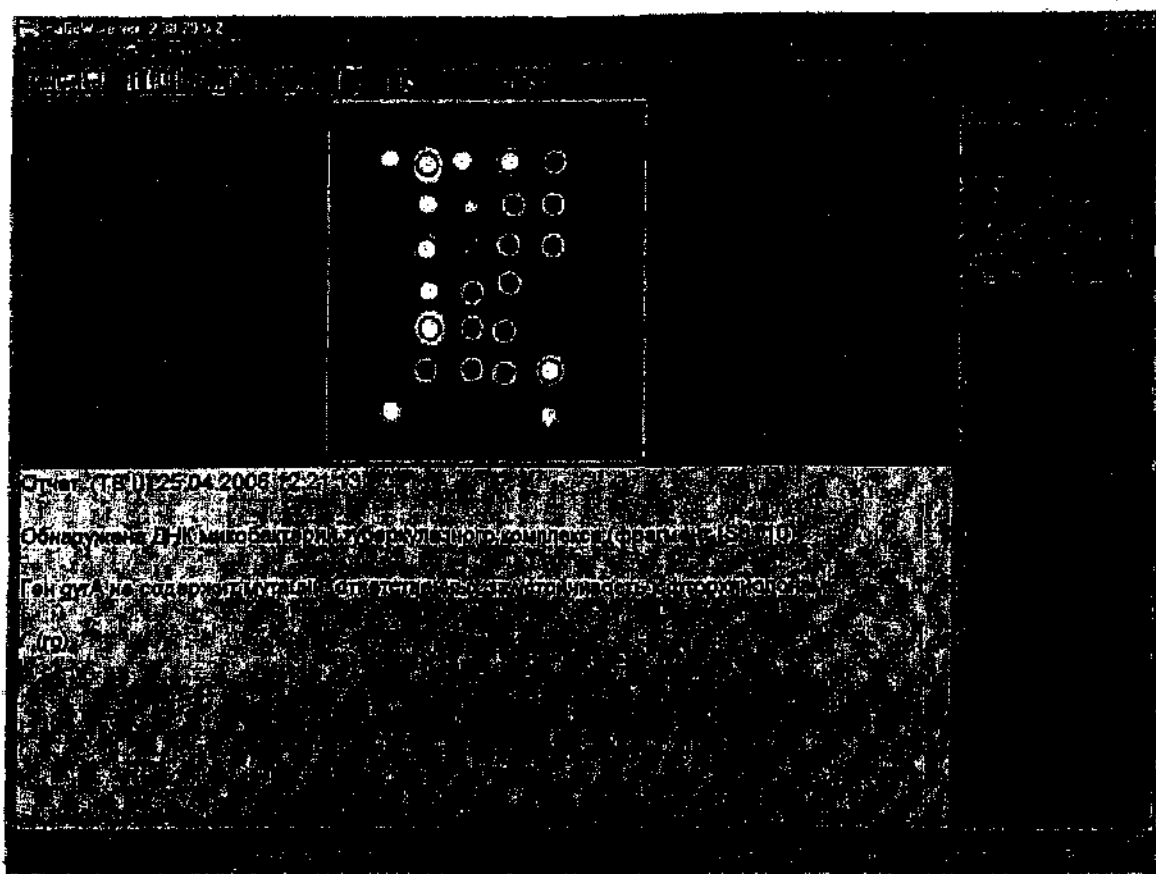


Рис. 3. Диалоговое окно режима 'Отчет'

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

9.1. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться в течение срока годности при следующих условиях:

Комплекты №№ 1 и 3 - при температуре +2-8 °С.

Комплект № 2 - при температуре -20 °С.

Комплекты №№ 4 и 5 - при комнатной температуре (+18-25 °С).

9.2. Срок годности набора - 3 мес.

9.3. Комплекты №№ 1 и 3 можно хранить при температуре до +25 °С не более 3 дней.

9.4. Комплект № 2 можно хранить при температуре 0 °С не более 1 дня.

9.5. Все реагенты после вскрытия флаконов и пробирок могут храниться не более 1 мес при условиях, указанных в п. 9.1.

9.6. Приготовленную смесь для обработки мокроты можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч.

9.7. Приготовленный промывающий раствор ПБ-1 можно хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

9.8. Полученный продукт, содержащий ДНК Микобактерий туберкулеза, можно хранить при температуре -20 °С не более 1 мес.

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

По вопросам, касающимся качества набора ТБ-БИОЧИП-2, следует обращаться в Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, строение 32, тел. (095) 135-11-77, 135-98-46; и в ИГКЛС ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 14А, тел (095) 120-60-95, 120-60-96.

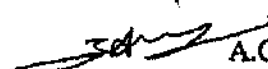
Научн. сотр. ИМБ РАН, канд. биол. наук

 С.А. Лапа

Научн. сотр. ИМБ РАН, канд. биол. наук

 Д.А. Грядунов

Зам. директора ИМБ РАН, д. ф.-м. н., проф.

 А.С. Заседателя

Руководитель лаборатории
молекулярно-генетических
исследований ГУ ЦНИИТ РАМН, д.м.н., проф.

 Л.Н. Черноусова

ООО «Биочип-ИМБ»

ПАСПОРТ № _____

Выдан « ____ » _____ 20__ г.

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА И
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
ФТОРХИНОЛОМ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ
ИЗОБРАЖЕНИЕМ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ
(ТБ-БИОЧИП-2)**

СЕРИЯ № _____

Значения контролируемых параметров:

Чувствительность 100 геном-эквивалентов

Специфичность (К+) штамм чувствителен к фторхинолонам

Результаты приведены на « ____ » _____ 20__ г.

Срок годности набора до « ____ » _____ 20__ г.

Условия хранения.

После вскрытия набора реагентов компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

Комплект №1 - при температуре от 2 до 8⁰С.

Комплект №2 - при температуре от минус 18 до минус 24⁰С.

Комплект №3 - при температуре от 2 до 8⁰С.

Комплекты №4, 5 - при температуре от 18 до 25⁰ С.

Количество наборов _____ шт.

ТОЛЬКО ДЛЯ ИН ВИТРО ДИАГНОСТИКИ

ОТК _____

ООО «Биочип-ИМБ»

ПАСПОРТ № _____

Выдан « ____ » _____ 20__ г.

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА И
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
ФТОРХИНОЛОНАМ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ
ИЗОБРАЖЕНИЕМ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ
(ТБ-БИОЧИП-2)**

СЕРИЯ № _____

Значения контролируемых параметров:

Чувствительность 100 геном-эквивалентов

Специфичность (К+) штамм чувствителен к фторхинолонам

Результаты приведены на « ____ » _____ 20__ г.

Срок годности набора до « ____ » _____ 20__ г.

Условия хранения.

После вскрытия набора реагентов компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

Комплект №1 - при температуре от 2 до 8⁰С.

Комплект №2 - при температуре от минус 18 до минус 24⁰С.

Комплект №3 - при температуре от 2 до 8⁰С.

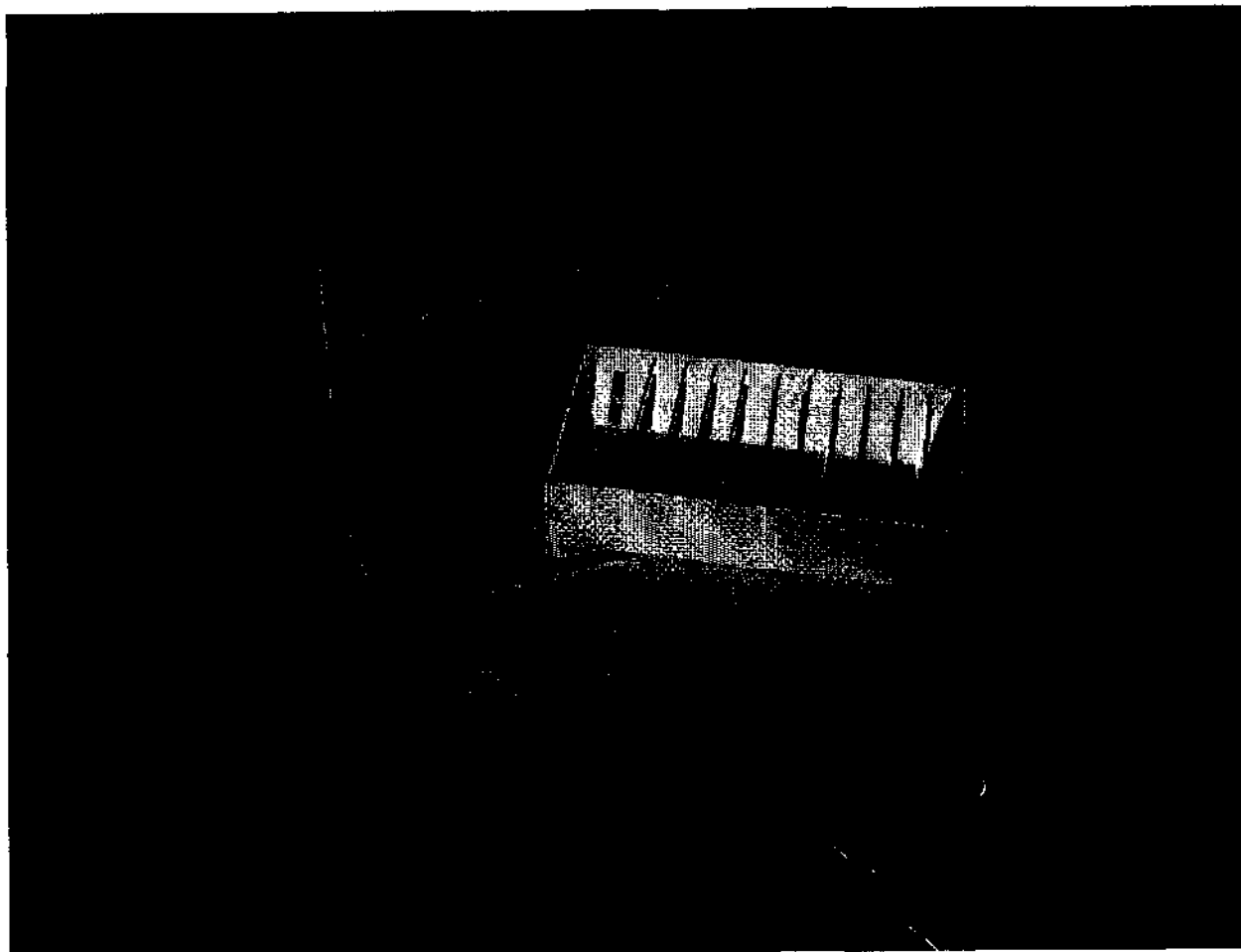
Комплекты №4, 5 - при температуре от 18 до 25⁰ С.

Количество наборов _____ шт.

ТОЛЬКО ДЛЯ ИН ВИТРО ДИАГНОСТИКИ

ОТК _____

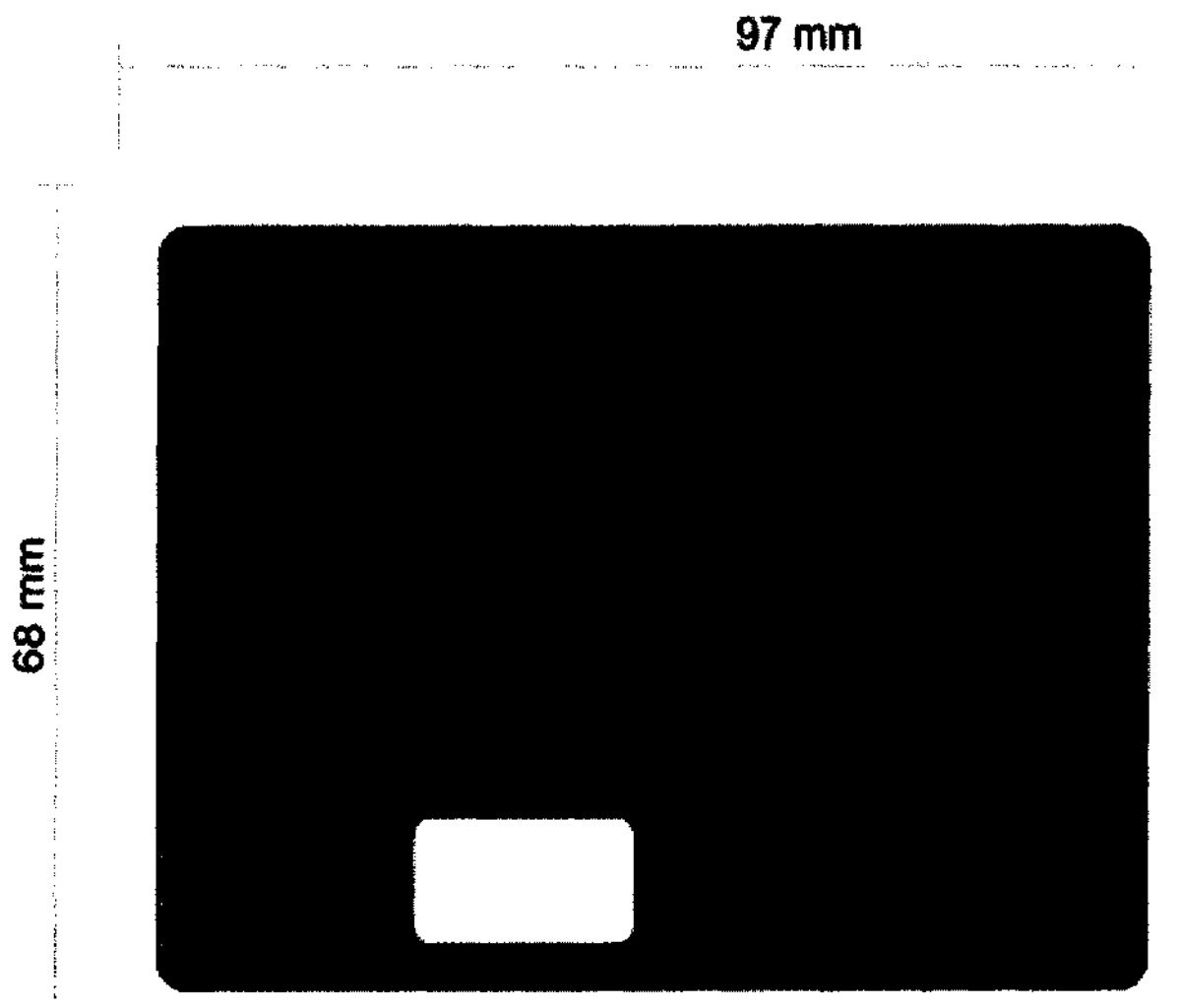
Фотография набора реагентов ТБ-Биочип-2



Фотография набора реагентов ТБ-Биочип-2



Этикетка на Набор реагентов ТБ-Биочип-2



**Этикетка
на Набор реагентов ТБ-Биочип-2**

