



**УТВЕРЖДАЮ**  
Генеральный директор  
ООО «Ветбиохим»  
А.В. Кривонос  
«15 января» 2018 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для индикации и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени  
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

### I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для индикации и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

1.2 Тест-система состоит из 2 наборов и рассчитана на выделение ДНК из 25 образцов и проведение 50 реакций ПЦР с двумя парами праймеров и двумя зондами для двух видов микобактерий (таблица 1).

Таблица 1

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I - для выделения ДНК			
1	Раствор – 1	6,0 мл	1 флакон
2	Раствор – 2	18,0 мл	1 флакон
3	Раствор – 3	6,0 мл	1 флакон
4	Раствор – 4	6,0 мл	1 флакон
5	Сорбент	2,0 мл	1 пробирка
6	Лизоцим	0,06 г	1 пробирка
7	Вода деионизованная	2,0 мл	1 пробирка
Набор II - для выявления ДНК микобактерий методом ПЦР в реальном времени			
Комплект общих реагентов			
1	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка
2	Таq-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
Комплект реагентов для детекции ДНК <i>M. bovis</i> и <i>M. tuberculosis</i>			
3	Праймеры №1	0,135 мл	1 пробирка
4	Зонд №1	0,03 мл	1 пробирка
5	Положительный контроль ДНК <i>M. bovis</i> BCG	0,2 мл	5 пробирок
Комплект реагентов для детекции ДНК <i>M. tuberculosis</i>			
6	Праймеры №2	0,135 мл	1 пробирка
7	Зонд №2	0,03 мл	1 пробирка
8	Положительный контроль ДНК <i>M. tuberculosis</i>	0,02 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для выявления и дифференциации ДНК *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis* в культурах микобактерий, а также материале от животных (кровь, фекалии, носовые и фарингеальные смывы, носовая и бронхиальная слизь, лимфоузлы, фрагменты паренхиматозных органов).

#### 1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-систем расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 13 мл и 20 мл, пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

Набор I и Набор II отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. На каждый пакет с компонентами наборов наклеена этикетка с указанием организации-производителя и разработчика и/или товарного знака, наименования набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения.

Набор I, упакованный в полиэтиленовый пакет, вложен в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены типографским способом следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя, полное наименование тест-системы, количество анализов, номер серии и контроля, дата изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение СТО, надпись «Для ветеринарного применения». В каждую упаковку вложена инструкция по применению тест-системы.

#### 1.4 Условия хранения

Набор I следует хранить при температуре от 2°C до 25°C, Набор II – при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

Транспортирование Набора I проводить при температуре от 2°C до 25°C. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления.

Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и неиспользованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов необходимо проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20-24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т или аналогичные.

## II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

2.1 Тест-система включает два комплекта компонентов для выявления микобактерий: один из них является универсальным и позволяет обнаружить как *M. bovis*, так и *M. tuberculosis* (комплект реагентов для детекции ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis*), а другой предназначен только для выявления ДНК *M. tuberculosis* (комплект реагентов для детекции ДНК *M. tuberculosis*). Для индикации суммарной ДНК *M. tuberculosis* и *M. bovis* используют праймеры №1 и зонд №1. Для идентификации ДНК *M. tuberculosis* используют праймеры №2 и зонд №2. Особенность полимеразной цепной реакции в реальном времени – возможность регистрации результата ПЦР в процессе реакции, в каждый момент времени.

2.2 Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют ДНК-зонды (короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, синтезированные химическим путем), комплементарные внутренним участкам – фрагментам ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis*. К зондам присоединены химические соединения: флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции. В ходе ПЦР происходит разрушение зонда, разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к появлению свечения. Регистрируя интенсивность свечения, исследователь может узнать о ходе реакции без дополнительной стадии – электрофореза.

## III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

### 3.1 Подготовка к работе

#### 3.1.1 Необходимые условия успешного проведения анализа

Строго соблюдать условия хранения и транспортирования компонентов тест-системы (см. п. 1.4).

Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.

На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромовой смесью, отмыта, стерилизована.

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять центрифугированием.

При открывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внут-

ренной поверхности крышек.

На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т. п.).

Готовить реакционные смеси и работать с прибором ПЦР в реальном времени следует в одноразовых перчатках.

### 3.1.2 Подготовка исследуемого материала

• **КРОВЬ:** пробы цельной крови должны быть обязательно консервированы 3-6%-ным раствором ЭДТА или 3,8%-ным раствором цитрата натрия. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Пробирки с цельной кровью смешанной с антикоагулянтом хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для выделения ДНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **НОСОВЫЕ И ФАРИНГЕАЛЬНЫЕ СМЫВЫ:** 5-10 мл смывов центрифугировать при 5000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость осторожно отобрать так, чтобы над осадком осталось примерно 200 мкл жидкости. Если осадка очень мало, то к пробе добавить еще 5-10 мл смыва и центрифугировать в том же режиме. Надосадочную жидкость отобрать, что бы осталось примерно 200 мкл жидкости, осадок суспендировать в оставшемся объеме жидкости и перенести 200 мкл получившейся суспензии в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл для выделения ДНК.

• **БРОНХИАЛЬНАЯ СЛИЗЬ:** для выделения ДНК поместить 200 мкл слизи в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **ОРГАНЫ:** для исследования использовать цельные лимфоузлы, кусочки печени или селезенки, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 10 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Образец органа измельчить стерильными ножницами или растереть в физиологическом растворе или в фосфатном буфере (приготовить примерно 10% суспензию). Для выделения ДНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **ФЕКАЛИИ:** для исследования использовать пробы фекалий массой (объемом) примерно 1-3 г (1-3 мл). Образцы хранить при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток. При исследовании фекалий без предварительного замораживания суспендировать их в фосфатном буфере или физиологическом растворе (приготовить 10-20%-ную суспензию), затем центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин. Для выделения ДНК использовать 200 мкл супернатанта, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл. При необходимости длительного хранения к 10-20%-ной фекальной суспензии добавить глицерин до конечной концентрации 10-15%, гомогенизировать, экспонировать пробу 30-40 минут и заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C. Хранить не более 7 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

• **КУЛЬТУРЫ МИКОБАКТЕРИЙ:** использовать 200 мкл культуры, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл, для выделения ДНК.

• **КОНТРОЛИ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения ДНК (п. 3.2). Положительным контролем этапа выделения является рекомбинантная ДНК *M. bovis* VCG. Пробирку с контролем размораживать непосредственно перед использованием, повторной заморозке не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл. Выделенную ДНК (5 мкл) использовать для проведения ПЦР. Положительным контролем этапа ПЦР (п.3.3) является рекомбинантная ДНК *M. tuberculosis*. Пробирку с контролем размораживать непосредственно перед использованием. В ПЦР использовать 5 мкл.

В качестве отрицательного контроля использовать 200 мкл деионизованной воды.

**Положительные контроли хранить при температуре от минус 18°C до минус 20°C, размораживать непосредственно перед использованием.**

### 3.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК из исследуемого биологического материала проводить с помощью Набора I - для выделения ДНК.

### 3.2.1 Обработка проб раствором-1 и лизоцимом.

**Внимание! На данном этапе положительный контроль не используется.**

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения («К-»).

- **Подготовка рабочего раствора-1 с лизоцимом:** отобрать в отдельный флакон или пробирку необходимое количество раствора-1, исходя из расчета 200 мкл на 1 пробу, включая «К-». К отобранному раствору-1 добавить лизоцим до конечной концентрации 10 мг/мл (например, на 10 образцов понадобится 2 мл раствора-1 и 20 мг лизоцима). Данный раствор готовить непосредственно перед употреблением, допускается хранение не более 48 часов при температуре от 2°C до 6°C.

- Внести в каждую подготовленную пробирку для исследуемых образцов и «К-» по 200 мкл рабочего раствора-1 с лизоцимом.

- В подготовленные пробирки с раствором-1 внести по 200 мкл образцов биологического материала и «К-» в следующей последовательности:

1. В пробирку, маркированную «К-», внести 200 мкл деионизированной воды;
2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;

- Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”.

- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2°C), каждые 3 минуты перемешивая на смесителе типа “Vortex”.

- Поместить пробы в термостат (например, «Гном», ДНК-Технология), инкубировать при температуре 95°C в течение 15 минут. **Примечание:** чтобы избежать самопроизвольного открывания пробирок при нагревании, следует придавить их сверху грузом или использовать специальные пробирки с защелкой.

### 3.2.2 Выделение ДНК (на данном этапе используется положительный контроль ДНК *M.bovis* BCG).

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая положительный («К+») и отрицательный («К-») контроли выделения.

- В случае образования кристаллов в растворе-2 и растворе-3, инкубировать их при температуре от 60°C до 65°C до полного растворения.

- Внести в каждую пробирку по 600 мкл раствора-2.

- Пробирку с сорбентом встряхнуть на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. В каждую пробирку с раствором-2 внести по 40 мкл ресуспендированного сорбента.

- Инкубированные пробы с раствором-1 и лизоцимом центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эпандорф” 2 минуты при максимальных оборотах. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с раствором-2 и сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести «К-», затем исследуемые пробы. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

- В пробирку, маркированную «К+», внести 200 мкл положительного контроля ДНК *M. bovis* BCG.

- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре (20±2°C), каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

- Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

- К осадку добавить 100 мкл раствора-3, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.

- К осадку добавить 100 мкл раствора-4, используя отдельный наконечник для каждой

пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.

- Осадок сушить в течение 10 минут при 56°C, крышки у пробирок должны быть открыты.

- Добавить к осадку 30 мкл деионизированной воды, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования осадка.

- Инкубировать пробы 10 минут при 56°C в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на смесителе типа “Vortex”. Центрифугировать в течение 1 мин при максимальных оборотах. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК и предназначена для проведения ПЦР в реальном времени (п. 3.3). Рекомендуется проводить ПЦР в реальном времени сразу после получения выделенных ДНК-проб. **Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6°C не более 15 минут.**

- При необходимости длительного хранения следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные маркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные пробы заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР в реальном времени, не допускается многократное размораживание проб.

### 3.3 Проведение ПЦР в реальном времени

Для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени использовать **Набор П - для выявления ДНК микобактерий методом ПЦР в реальном времени.**

3.3.1 Подготовка пробирок и приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР в реальном времени.

Для каждой исследуемой пробы параллельно поставить две реакции. Одна из них позволяет обнаружить ДНК *M. bovis* и ДНК *M. tuberculosis* с помощью универсальных праймеров №1 и зонда №1, другая предназначена только для выявления ДНК *M. tuberculosis* с помощью специфических праймеров №2 и зонда №2 (таблица 2).

Таблица 2.

Объект анализа	Праймеры	Зонды
<i>M. bovis</i> и <i>M. tuberculosis</i>	Праймеры №1	Зонд №1
<i>M. tuberculosis</i>	Праймеры №2	Зонд №2

Подготовить необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой с учетом положительных и отрицательных контрольных образцов.

Параллельно в отдельных пробирках приготовить две реакционные смеси (см. таблицу 3) на n+1 образцов, где n – количество проб с учетом отрицательных и положительных контролей. Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 3. Все реактивы, **кроме Таq-полимеразы**, должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Перед открыванием пробирок рекомендуется осадить капли со стенок и крышек кратким центрифугированием (5-10 сек). Таq-полимеразу добавить в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать ее во льду, нагревание не допускается.

Таблица 3

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Смесь для выявления суммарной ДНК <i>M. bovis</i> и <i>M. tuberculosis</i>		
Буфер для ПЦР	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР №1	4,5	4,5 x (n+1)
Зонд №1	1,0	1,0x(n+1)
Тақ-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)
Смесь для выявления ДНК <i>M. tuberculosis</i>		
Буфер для ПЦР	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР №2	4,5	4,5 x (n+1)
Зонд №2	1,0	1,0x(n+1)
Тақ-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Каждую смесь перемешать, избегая образования пены и немедленно внести по 20 мкл в подготовленные пробирки, затем внести в них по 5 мкл выделенных проб в следующей последовательности:

1. В пробирки для отрицательных контролей внести 5 мкл «К-»;
2. В соответствующие пробирки внести по 5 мкл исследуемых проб;
3. В пробирки для положительных контролей внести 5 мкл выделенной ДНК *M. bovis* BCG (если используется смесь для детекции суммарной ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis*) или 5 мкл ДНК *M. tuberculosis* (если используется смесь для детекции *M. tuberculosis*).

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Поместить пробирки в прибор для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

### 3.3.2 Проведение ПЦР в реальном времени с помощью прибора ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

- Запустить программу **RealTime\_PCR**;
- В диалоговом окне выбора режима работы программы выбрать существующего оператора или добавить нового оператора. Затем выбрать режим **Работа с прибором**;
- В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый для работы прибор и нажать кнопку **Подключить**. После этого на экране появится окно работы с прибором с кнопкой **Прибор включен** (необходимо дождаться, пока кнопка станет зеленого цвета);
- В меню **Тест** в верхней части рабочего окна **RealTime\_PCR** выбрать команду **Создать/редактировать тест**;
- Выбрать **Создать новый тест**, ввести название нового теста и нажать **ОК**. На экране появится окно **Тест**;
- В поле **Описание** рекомендуется указать назначение и особенности теста; в пункте **Анализ** в окошке **Тип** выбрать **Качественный**, в окошке **Метод** выбрать **Пороговый (Ct)**; в пункте **Пробирки** отметить образцы, которые будут использоваться при проведении исследования: **Образец**, **Контроль +**, **Контроль –**; в пункте **Контроли** указать количество используемых положительных и отрицательных контрольных образцов; в пункте **Объем рабочей смеси в пробирке** выставить **25 мкл**;
- В пункте **Флуорофоры** для каналов **Fam** и **Nex** выбрать пункт **Специфика**, для остальных каналов – пункт **Отсутствует**;
- В пункте **Программа амплификации** выбрать кнопку **Создать новую программу**; в окне **Шаблон программ амплификации** выбрать наиболее подходящий по структуре шаблон. Нажать кнопку **Применить** При необходимости использовать кнопки **Добавить строку**, **Удалить строку**, **Добавить блок**, **Удалить блок**.
- В поле **Имя программы** написать название программы; при необходимости заполнить поле **Описание**;
- Отредактировать программу амплификации для выявления ДНК *M.bovis* и *M.tuberculosis*. Для этого выставить температурно-временные параметры согласно таблице 4:

Таблица 4

№ блока	Температура, С°	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	94,0	5	0	1	
2	94,0	0	15	40	
	60,0	0	15		✓
	72,0	0	30		

- Нажать кнопку **ОК**;
- В появившемся окне в поле **Имя файла** ввести имя созданной программы, используя буквы латинского алфавита; в поле **Папка** выбрать папку на диске для сохранения программы и нажать кнопку **Сохранить**;
- В появившемся окне **Тест** нажать кнопку **ОК**;
- На экране появится рабочее окно **RealTime\_PCR** и вкладка **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в открывшемся окне выбрать название своего теста из списка;
- Указать количество исследуемых образцов и количество повторов (дублей) каждого образца в разделе **Образцы**. При необходимости можно изменить количество положительных и отрицательных контролей. Нажать кнопку **ОК**. Данные вносятся в протокол автоматически. При необходимости можно их отредактировать непосредственно в окне протокола. Расположение пробирок в блоке амплификатора также заполняется автоматически, при необходимости можно расположить их в произвольном порядке.
- В таблице окна **Протокол** для образцов, исследуемых на наличие суммарной ДНК *M. bovis* и ДНК *M.tuberculosis* (праймеры №1, зонд №1) во вкладке **Fam** выбрать **Специфика**, во вкладке **Hex - Отсутствует**. Для образцов, исследуемых на наличие ДНК *M.tuberculosis* (праймеры №2, зонд №2) во вкладке **Fam** выбрать **Отсутствует**, во вкладке **Hex - Специфика**.
- Для перехода к запуску программы амплификации нажать кнопку **Применить**;
- На экране появится вкладка **Запуск программы амплификации**. При необходимости можно заполнить поле **Комментарий**;
- Проверить программу амплификации, при необходимости ее можно отредактировать, нажав кнопку **Редактировать**. На экране появится окно **Редактор программ амплификации** с таблицей данных используемой программы;
- После внесенных изменений нажать кнопку **ОК**. На экране появится окно запуска программы амплификации.
- Подготовить пробирки согласно п.3.3.1;
- В окне запуска программы амплификации нажать кнопку **Открыть блок**. Поставить подготовленные пробирки в гнезда амплификатора строго в соответствии с расположением, указанным в протоколе. Нажать кнопку **Заккрыть блок**;
- Нажать кнопку **Запуск программы**.
- Назвать эксперимент и сохранить его на диске.
- После завершения работы программы нажать кнопку **ОК**, чтобы перейти к анализу оптических измерений.

### 3.3.3 Проведение ПЦР в реальном времени с помощью прибора «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

Поместить подготовленные в п. 3.3.1 пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene. Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 или «Rotor-Gene» 6000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6 или 1.7 (build 67) соответственно, или выше. Провести программирование амплификатора:

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы;
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**;
- Нажать кнопку **Next/Далее**;
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**;
- Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 ml oil layer volume/15.L** **объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**. Задать следующие параметры эксперимента:
  1. Hold/Удерж.темп-ры 94°C – 5 мин;
  2. Cycling/Циклирование 94°C – 15с,  
60°C – 15с,  
72°C – 30с  
Cycle repeats/Цикл повторить 5 times/раз.
  3. Cycling2/Циклирование2 94°C – 15 с,  
60°C – 15 с – Детекция флюоресценци

72°C – 30 с

Cycle repeats/Цикл повторить – 40 times/раз.

▪ Флюоресценцию измерять при 60°C на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow**. Нажать дважды кнопку ОК/Да.

▪ Нажать дважды кнопку «ОК»/«Да».

▪ В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-тых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для обоих каналов (FAM/Green, JOE/Yellow) установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5FI** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10FI**. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

▪ Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

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

### 3.3.4 Проведение ПЦР в реальном времени на приборе BioRadiQ5 («Bio-Rad», США).

Чтобы начать работу на приборе BioRadiQ5 необходимо:

1. Включить прибор

2. Включить компьютер

3. Открыть программу BioRadiQ5

4. В закладке Protocol создать новый документ (активизировать «иконку» Creat new), установить температурно-временной режим проведения реакции (таблица 5):

Таблица 5

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint	PCR/MeltData Acquisition
1	1	1	5:00	95.0	
2	40				
		1	0:15	95.0	
		2	0:15	60.0	
		3	0:30	72.0	Real Time

5. Сохранить файл (Save & Exit Protocol Editing)

6. В закладке Plate создать новый документ:

- активизировать «иконку» Creat new;

- обозначить лунки, в которых предполагается разместить пробирки с исследуемой реакционной смесью;

- из списка флуорофоров выбрать соответствующий краситель

- в верхнем правом углу закладки **Setup** изменить параметры Sample Volume, Seal Type, Vessel Type в соответствии с калибровкой прибора;

- сохранить документ (Save & Exit Protocol Editing);

7. Подготовить пробирки для n+1 образцов с реагентами для ПЦР в реальном времени как описано в п. 3.3.1.

8. Поместить пробирки с исследуемой реакционной смесью в лунки термоциклера;

9. В окне Data File активизировать «иконку» Run, затем Run End Point.

## IV АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

### 4.1 Анализ результатов амплификации специфических участков ДНК *M.bovis* и *M.tuberculosis* на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия).

После завершения работы программы нажать кнопку **ОК** и перейти к анализу результатов оптических измерений:

1. В поле **Тип анализа** указать **Ct (Cp)** для всех каналов, в поле **Метод – Пороговый (Ct)**;

2. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. В открывшейся вкладке установить:



Критерий положительного результата ПЦР – 90%, Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 10%, верхняя граница/порог нормализации данных – 30%. Нажать кнопку **Применить**.

3. Для обоих каналов (Fam и Hex) установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) так, чтобы она пересекала кривую флуоресценции на участке характерного экспоненциального подъема, переходящего в линейный подъем.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 6.

Таблица 6

Название образца	Праймеры №1, Зонд №1, сигнал по каналу Fam	Праймеры №2, Зонд № 2 сигнал по каналу Hex	Комментарии к результатам ПЦР в реальном времени
К-	отсутствует или $Ct \geq 35$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует ДНК <i>M. bovis</i> и ДНК <i>M.tuberculosis</i> .
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	присутствует, $Ct \leq 34$	В пробе присутствует ДНК <i>M. tuberculosis</i> либо суммарная ДНК <i>M. tuberculosis</i> и <i>M. bovis</i> . Результат положительный.
Образец 2	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В пробе присутствует ДНК <i>M. bovis</i> . Результат положительный.
Образец 3	отсутствует или $Ct \geq 35$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В образце отсутствует ДНК <i>M. bovis</i> и ДНК <i>M.tuberculosis</i> . Результат отрицательный.
Положительный контроль ДНК <i>M.bovis</i> BCG	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В положительном контроле присутствует ДНК <i>M.bovis</i>
Положительный контроль ДНК <i>M.tuberculosis</i>	отсутствует или $Ct \geq 35$	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует ДНК <i>M.tuberculosis</i>

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей, согласно таблице 6. В случае появления в отрицательном контроле значения  $Ct \leq 34$  по любому из каналов флуоресценции результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить исследование всех проб, начиная с этапа выделения ДНК, приняв меры для ликвидации контаминации.

#### 4.2 Анализ результатов амплификации специфических участков ДНК *M.bovis* и *M.tuberculosis* на приборе «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия).

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**;

- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек.уклона**;

- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**;

- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.03**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**;

- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**. В меню основного окна **Quantita-**

tion analysis/Количественный анализ должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек.уклона**;

- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**;

- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.03**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 7.

Таблица 7

Название образца	Праймеры №1, Зонд №1, сигнал по каналу Fam	Праймеры №2, Зонд № 2 сигнал по каналу Joe	Комментарии к результатам ПЦР в реальном времени
К-	отсутствует или $Ct \geq 35$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В отрицательном контроле отсутствует ДНК <i>M. bovis</i> и ДНК <i>M.tuberculosis</i> .
Образец 1	присутствует, $Ct \leq 34$	присутствует, $Ct \leq 34$	В пробе присутствует ДНК <i>M. tuberculosis</i> либо суммарная ДНК <i>M. tuberculosis</i> и <i>M. bovis</i> . Результат положительный.
Образец 2	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В пробе присутствует ДНК <i>M. bovis</i> . Результат положительный.
Образец 3	отсутствует или $Ct \geq 35$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В образце отсутствует ДНК <i>M. bovis</i> и ДНК <i>M.tuberculosis</i> . Результат отрицательный.
Положительный контроль ДНК <i>M.bovis</i> BCG	присутствует, $Ct \leq 34$	отсутствует или $Ct \geq 35$	В положительном контроле присутствует ДНК <i>M.bovis</i>
Положительный контроль ДНК <i>M.tuberculosis</i>	отсутствует или $Ct \geq 35$	присутствует, $Ct \leq 34$	В положительном контроле присутствует ДНК <i>M.tuberculosis</i>

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей, согласно таблице 7. В случае появления в отрицательном контроле значения  $Ct \leq 34$  по любому из каналов флуоресценции результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить исследование всех проб, начиная с этапа выделения ДНК, приняв меры для ликвидации контаминации.

#### При работе на приборе BioRadiQ5

По окончании реакции в окне **PCR Quant** появится график зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов. Кривые, преодолевшие пороговый уровень, считаются положительными, кривые ниже уровня пороговой линии считаются отрицательными. Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей.

## V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. Работать необходимо в перчатках. При случайном попадании компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16