



# ВЕТ ФАКТОР



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-ТУБ-ДИФ-ФАКТОР» для выявления ДНК возбудителей туберкулёза *M. bovis* и *M. tuberculosis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле

21.10.60-164-51062356-2018

Для диагностики *in vitro*

## Содержание

Список сокращений .....	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора.....	4
2.1 Принцип действия.....	4
2.2 Состав набора.....	4
3. Аналитические характеристики.....	6
4. Меры предосторожности.....	6
5. Материалы и оборудование .....	7
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб .....	8
6.1 Отбор материала для исследования.....	8
6.2 Подготовка исследуемых проб .....	9
7. Проведение анализа .....	10
7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб .....	10
7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР .....	10
7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле. ....	12
8. Интерпретация результатов анализа .....	12
9. Условия транспортирования .....	14
10. Условия хранения .....	14
11. Срок годности.....	14
Приложение 1. Приготовление реакционной смеси .....	15
Приложение 2. Лист вносимых изменений .....	16

## Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

## 1. Назначение

Набор предназначен для выявления для выявления ДНК возбудителей туберкулёза *M. bovis* и *M. tuberculosis* в биологическом материале (кровь, мазки со слизистых, фрагменты тканей и органов, фекалии, моча, молоко) методом амплификации ДНК с последующей детекцией продуктов амплификации электрофорезом в агарозном геле.

## 2. Характеристика набора

### 2.1 Принцип действия

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагменты геномов *M. bovis* и *M. tuberculosis* и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага T4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции.

Детекция продуктов амплификации осуществляется электрофоретически с разделением продуктов амплификации в агарозном геле.

### 2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы)
- 2) для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Состав комплекта №1

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР ТУБ-ДИФ	жидкость темно-зеленого цвета	830	1660	1
2	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE.	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	17	33	1
3	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1
4	Минеральное масло МИН. МАСЛО	прозрачная вязкая бесцветная жидкость	2000	2000	1(2)

Таблица 2. Состав комплекта №2

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО ТУБ-ДИФ	прозрачная бесцветная жидкость <sup>1</sup>	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО TUBERCULOSIS	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1
4	Положительный контрольный образец, ПКО BOVIS	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

<sup>1</sup> Возможна легкая опалесценция

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Выделение ДНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, и также наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный. В набор не входят реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ПЦР-ЭФ-ФАКТОР» или аналогичный.

### 3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК других микроорганизмов: *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma sinovia*; *Brucella suis*; *Brucella abortus*; *Brucella ovis*; *Brucella canis*; *Pasterella multocida*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium avium*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter fetus*; *Clostridium perfringens*; *Salmonella dublin*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus suis*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК человека, свиньи, КРС, собаки, кошки, курицы, голубя.

### 4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II группы патогенности (опасности)» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследование проводится в два этапа в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

## 5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения ДНК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Ахуген», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК по п 2.2.

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Терчик», «ДТ 96», ДНК-технология).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).

- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,5 (0,2) и 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

#### **Для зоны электрофоретического анализа**

- Реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле по 2.2
- Камера для горизонтального электрофореза (например: «SE2», «Хеликон»);
- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например: Эльф-4, «ДНК-технология»);
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например: «Vilber Lourmat»);
- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например: «Vilber Lourmat»), «Биотест-1»);
- Микроволновая печь для плавления агарозы;
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для приготовления агарозы;
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза;
- Штатив для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-50 мкл;
- Одноразовые наконечники до 200 мкл;
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромистый этидий;
- Отдельный халат;
- Одноразовые перчатки.

### **6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб**

#### **6.1 Отбор материала для исследования**

Для исследования используют следующий материал:

- Цельная кровь. Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 10 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.
- Мазки со слизистой носоглотки снимают с помощью стерильного зонда, зонд помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора



- Носовую слизь помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора
  - Фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.) отбирают в стерильный контейнер Лимфатические узлы (отбирают на исследование целиком)
    - Молоко, отбирают в объеме 10-30 мл в стерильную посуду
    - Мочу отбирают в количестве 10 – 20 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер.
    - Фекалии отбирают в стерильные контейнеры в количестве 1–3 г
- Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

Пробы мочи:

при комнатной температуре (15 – 25 °С) - в течение 12 часов;

Другие пробы:

- при температуре 2 - 8 °С - в течение 1 суток;

- при температуре не выше минус 16 °С - в течение месяца;

- при температуре не выше минус 68 °С - длительно.

**Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.**

## 6.2 Подготовка исследуемых проб

Пробы цельной крови, мазки со слизистой носоглотки и носовую слизь исследуют без предварительной подготовки.

Исследуемые пробы тканей и органов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавляют пятикратный объем стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера и тщательно перемешивают. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и отстаивают в течение 5-7 мин после чего откручивают на миницентрифуге при 1,5-2,0 тыс. об/мин. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции ДНК.

Молоко в объеме до 10 мл обеззараживают и центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 0,1 мл суспензии используют для выделения ДНК.

Мочу в объеме 10 мл центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно сливают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 100 мкл его используют для экстракции ДНК. До получения осадка мочу нельзя охлаждать или замораживать.

Из фекалий готовят 10 % суспензию в физиологическом растворе, центрифугируют при 1,5 тыс об/мин в течение 5 мин, 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции ДНК.

## 7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-Ф-ТУБ-ДИФ - ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение ПЦР;
- анализ продуктов амплификации методом электрофореза (на этом этапе дополнительно используют набор реагентов для электрофоретического анализа, например набор «ПЦР-ЭФ-ФАКТОР»);
- учет результатов анализа.

### 7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО ТУБ-ДИФ**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять ДНК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК.

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

### 7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР

**Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.**

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ТУБ-ДИФ** и **ДНК буфера**.

В отдельной пробирке смешать компоненты набора реагентов из расчета на каждую реакцию<sup>2</sup>:

---

<sup>2</sup>Объемы реагентов ПЦР СМЕСЬ ТУБ-ДИФ и TAQ POLYMERASE на различное количество образцов приведены в Приложении 1

- 15 мкл ПЦР СМЕСЬ ТУБ-ДИФ;
- 0,3 мкл TAQ POLYMERASE

Перемешать смесь на вортексе (без вспенивания) и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

В случае использования амплификаторов без подогревающейся крышки (например, «Терцик», «ДНК технология») сверху в пробирки внести по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки (под масло или непосредственно на масло) внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл ДНК буфера;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО TUBERCULOSIS.
- г) в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО BOVIS.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-2 секунды). Установить пробирки в амплификатор. Режим термоциклирования приведен в Таблицах 3, 4.

Таблица 3. Температурно-временной режим амплификации («Терцик», ДНК технология, ПЦР в пробирках объемом 0,5 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим (точный)	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 20 сек	40
	60°C – 30 сек	
	72°C – 30 сек	
3	72 °C – 2 мин	1

Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации приборов с подогревающейся крышкой (например «ДТ 96», ДНК технология, ПЦР в пробирках объемом 0,2 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95 °C - 20 сек	40
	58 °C -10 сек	
	72 °C – 20 сек	
3	72 °C – 2 мин	1

После окончания реакции переставить пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре. Для длительного хранения требуется заморозка.

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.

### 7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

**Внимание:** Работа с амплифицированными продуктами должна производиться в отдельной комнате сотрудником, не производящим манипуляций в чистых помещениях.

Поставить электрофорез исследуемых и контрольных проб согласно инструкции производителя набора для детекции амплифицированной ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

## 8. Интерпретация результатов анализа

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной НК.

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Оценка результатов анализа контрольных образцов.

Контрольные образцы	Этап анализа	Специфическая полоса на электрофореграмме		
		168 пар оснований <i>M. bovis</i>	262 пар оснований <i>M. tuberculosis</i>	500 пар оснований (ВКО)
ВК-	Экстракция НК	нет	нет	да
К-	ПЦР	нет	нет	нет
К+ TUBERCULOSIS	ПЦР	нет	да	да
К+ BOVIS	ПЦР	да	нет	да

Появление специфической полосы ПЦР продукта 168 пар оснований и/или 262 пар оснований для отрицательного контроля этапа экстракции **ВК-** и полос 168 пар оснований, 262 и/или 500 пн для отрицательного контроля этапа ПЦР **К-** свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

На дорожках с исследуемыми образцами должно наблюдаться одна или две полосы, совпадающими по подвижности с полосами от образцов **К+** (ПКО TUBERCULOSIS и ПКО BOVIS).

Образец считается отрицательным (ДНК *M. tuberculosis* и *M. bovis* отсутствует) если не наблюдается амплификации специфических полос на уровне 168 и 262 пар нуклеотидов и при этом наблюдается специфическая полоса ВКО на уровне 500 пар нуклеотидов.

**ДНК *M. Tuberculosis*** присутствует если наблюдается полоса, подвижность которой совпадает с подвижностью средней полосы (262 пар нуклеотидов) на дорожке **К+** (ПКО TUBERCULOSIS). Наличие верхней полосы не обязательно.

**ДНК *M. Bovis*** присутствует если наблюдается полоса, подвижность которой совпадает с подвижностью нижней полосы (168 пар нуклеотидов) на дорожке **К+** (ПКО ПКО BOVIS). Наличие верхней полосы не обязательно.

Исследуемые образцы, для которых на дорожках отсутствуют специфические полосы, требуют повторного проведения исследования. Отсутствие полосы ВКО (500 пар нуклеотидов) при отсутствии амплификации целевого ПЦР продукта (*M. Tuberculosis* (262) или *M. Bovis* (168)) указывает на наличие ингибиторов в пробе (ах) или на ошибки при постановке реакции. Необходимо провести исследование начиная с этапа экстракции НК.

**ВНИМАНИЕ!** При получении сомнительных результатов рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации.

## **9. Условия транспортирования**

Набор «ПЦР-Ф-ТУБ-ДИФ-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

## **10. Условия хранения**

Хранение комплектов набора «ПЦР-Ф-ТУБ-ДИФ-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

## **11. Срок годности**

Срок годности набора реагентов «ПЦР-Ф-ТУБ-ДИФ-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Приготовление реакционной смеси

Количество реакций	ПЦР смесь ТУБ-ДИФ, мкл	TAQ POLYMERASE, мкл
3	45	0,9
4	60	1,2
5	75	1,5
6	90	1,8
7	105	2,1
8	120	2,4
9	135	2,7
10	150	3
15	225	4,5
20	300	6
25	375	7,5
30	450	9
35	525	10,5
40	600	12
45	675	13,5
50	750	15
55	825	16,5

**Приложение 2. Лист вносимых изменений**

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений



Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений