

ООО «БИОЧИП-ИМБ»

СПОЛИГО-БИОЧИП

РУКОВОДСТВО

*ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ СПОЛИГОТИПИРОВАНИЯ
МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО И БЫЧЬЕГО ТИПОВ
МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ
(СПОЛИГО-БИОЧИП)**

Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере
здравоохранения и социального развития РФ
№ ФСР 2012/13826 от 30.08.2012 г.



* Руководство составлено на основе Инструкции по применению набора реагентов для сполиготипирования микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего типов методом гибридизации на биологическом микрочипе (СПОЛИГО-БИОЧИП) по ТУ 9398-011-02699501-2009, входящей в комплект регистрационной документации КРД № 18251 от 31.05.2012, утвержденной приказом Росздравнадзора от 30августа 2012 г. № 1123-Пр/12

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА.

1.1. Набор реагентов СПОЛИГО-БИОЧИП предназначен для типирования микобактерий туберкулёзного комплекса с использованием специализированного биочипа. Набор позволяет дифференцировать микобактерии туберкулеза человеческого или бычьего типов, различать виды, входящие в состав микобактерий туберкулёзного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*BCG, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*), а также определять принадлежность к основным семействам *Mycobacterium tuberculosis*, таким как Beijing, LAM9, T1, T5, Haarlem и др., что важно не только с эпидемиологической, но и с клинической точки зрения.

Так, изоляты семейства Beijing, широко распространенные на территории Российской Федерации, преобладают у больных с тяжелыми формами туберкулеза, демонстрируют высокую вирулентность и трансмиссивность, ассоциацию с множественной лекарственной устойчивостью (Ignatova, A., S. Dubiley, V. Stepanshina, and I. Shemyakin. 2006. Predominance of multidrug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. *J. Med. Microbiol.* 55:1413-1418. Hanekom, M., G. D. van der Spuy, E. Streicher, S. L. Ndabambi, C. R. McEvoy, M. Kidd, N. Beyers, T. C. Victor, P. D. van Helden, and R. M. Warren. 2007. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family was associated with an increased ability to spread and cause disease. *J. Clin. Microbiol.* 45:1483-1490).

Вторым генетическим семейством по частоте встречаемости является семейство LAM. Представленность данного семейства в некоторых районах Центрального региона достигает 50%, однако об особенностях семейства ничего не известно (Dubiley S, Kirillov E, Ignatova A, Stepanshina V, Shemyakin I. Molecular characteristics of the *Mycobacterium tuberculosis* LAM-RUS family prevalent in Central Russia. *J Clin Microbiol.* 2007 45(12):4036-8).

Наконец, семейство Haarlem 4 (в настоящее время – Ural), также циркулирующее на территории РФ, демонстрирует сниженную вирулентность в экспериментальных моделях, а также, по-видимому, ассоциировано с чувствительной формой туберкулёза (Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol.* 2012.12(4):619-29).

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

2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ НАБОРА И СТАДИИ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

2.1. Принцип действия набора основан на анализе региона прямых повторов (DR = direct repeat, *англ.*) генома микобактерий туберкулёзного комплекса. Исследование данного генетического локуса позволяет однозначно определить профиль штамма микобактерий туберкулёзного комплекса по наличию/отсутствию 43 последовательностей спейсеров, фланкированных прямыми повторами.

2.2. Для получения точного профиля сполиготипирования для анализа рекомендуется использовать образцы ДНК, выделенные из клинических изолятов. При анализе клинического материала (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, эксудат, содержимое холодных абсцессов) в силу вероятного

присутствия смешанных популяций штаммов возможно получение неинтерпретируемой гибридной картины.

- 2.3. Методика проведения анализа с использованием набора СПОЛИГО-БИОЧИП включает одну стадию ПЦР с последующей гибридизацией полученных ПЦР-продуктов на биочипе. В ходе ПЦР происходит наработка продуктов, содержащих спейсерные регионы, фланкированные прямыми повторами DR, с использованием праймеров, специфичных к последовательности прямого повтора (Рис. 1).

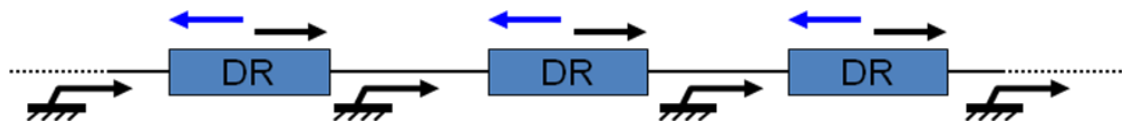


Рисунок. 1. Схема амплификации региона прямых повторов (DR)

- 2.4. Гибридизацию на биологическом микрочипе проводят с ПЦР-продуктами с целью установления наличия/отсутствия каждой из 43 последовательностей спейсеров в геноме возбудителя туберкулеза. Биочип включает 43 элемента, каждый из которых содержит уникальный зонд, специфичный к одному из 43 спейсеров региона прямых повторов (Рис. 2)

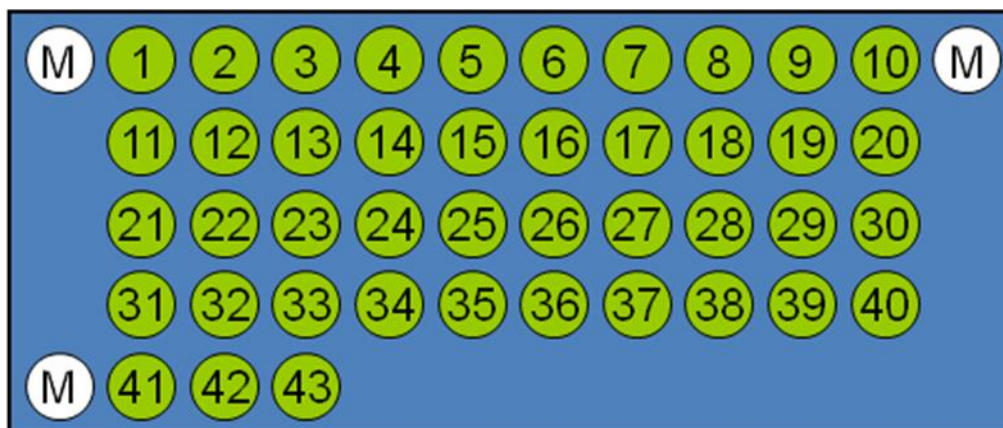


Рисунок. 2. Схема биочипа в составе набора СПОЛИГО-БИОЧИП. Цифрами 1-43 обозначены элементы, содержащие зонды, специфичные к каждому из 43 спейсеров. Ячейки с индексом 'M' являются маркерами флуоресценции и необходимы для автоматической обработки результатов гибридизации.

- 2.5. Анализ результатов гибридизации проводят на универсальном аппаратно-программном комплексе (УАПК) для анализа биочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006, Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФСР 2010/08002). Для возбуждения флуорофорных групп красителя, встроенного в процессе стадии ПЦР в исследуемые фрагменты генома и входящего в состав гибридных комплексов в ячейках биочипа, используется монохроматический свет с длиной волны 650 нм. Флуоресцентные сигналы каждой ячейки регистрируются ПЗС-камерой и подвергаются оцифровке. Программное обеспечение «Imageware», входящее в состав УАПК, позволяет сравнить флуоресцентные сигналы в ячейках, определить, в каких ячейках образовались совершенные гибридные комплексы. Интерпретация результатов гибридизации на биочипе осуществляется программно в автоматическом режиме с выдачей информации о профиле (сполиготипе) штамма микобактерий туберкулезного комплекса в соответствии с международной базой данных SPOLDB4 (http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html).

3. СОСТАВ НАБОРА.

Набор рассчитан на проведение 100 анализов, не включая положительные и отрицательные контрольные образцы

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

Комплект № 1 для выделения ДНК Микобактерий туберкулезного комплекса из биологического материала включает *:

- **Деконт-А**(реагент А для деконтаминации образцов) – 10 пробирок (по 0,25 г);
- **Деконт-Б**(реагент Б для деконтаминации образцов) – 10 флаконов (по 50 мл);
- **ПБ-1**(промывочный буфер № 1) – 5 флаконов (по 25 мл);
- **ПБ-2**(промывочный буфер № 2) – 1 флакон (20 мл);
- **ЛБ**(лизирующий буфер) – 1 флакон (10 мл).

Комплект № 2 для проведения стадии ПЦР включает:

- **ПЦР-буф**(10-кратный буфер для ПЦР с хлоридом магния) – 1 пробирка (0,36 мл);
- **дНТФ**(водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов для проведения реакции ПЦР) – 1 пробирка (0,36 мл);
- **ПР-1** (водный раствор флюоресцентно-меченых праймеров для проведения ПЦР) – 1 пробирка (0,36 мл);
- **Тaq**(Тaq-полимераза) – 1 пробирка (0,12 мл);
- **УДГ** (урацил-ДНК-гликозилаза) – 1 пробирка (0,07 мл);
- **К+**(положительный контрольный образец ДНК *M. tuberculosis*) – 1 пробирка (0,1 мл);
- **К-**(отрицательный контрольный образец) – 1 пробирка (0,1 мл);
- **ММ**(масло минеральное) – 2 пробирки (по 2 мл);
- **МQ**(вода деионизованная для проведения ПЦР) – 2 пробирки (по 1,5 мл).

Комплект № 3 для проведения гибридизации на микрочипе включает:

- **ГБ**(буфер для гибридизации) – 1 пробирка (2 мл).

Комплект № 4 включает биологические микрочипы – 120 штук.

* **Примечание.** Для обработки клинических изолятов микобактерий туберкулезного комплекса и выделения микобактериальной ДНК вместо Комплекта № 1 допускается применение других коммерческих наборов и автоматических роботизированных станций, разрешенных к применению в практике клинико-диагностических лабораторий.

4. ТРЕБОВАНИЯ К ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ.

- 4.1. Аналитическая чувствительность - 400 геном-эквивалентов микобактериальной ДНК.
- 4.2. Специфичность: набор выявляет 43 нуклеотидных последовательности спейсеров региона прямых повторов со специфичностью не менее 99,5%.
- 4.3. Время проведения анализа – не более 1 суток.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

- 5.1. Все реагенты, входящие в состав набора, используют только для применения *in vitro* и по их прямому назначению.
- 5.2. При работе необходимо соблюдать требования ГОСТ 12.2.003-91 (Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности), Приказа МЗ РФ №64 от 21 февраля 2000 г. «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях», СП 2.2.4.548-96 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».
- 5.3. При работе с клиническими изолятами необходимо придерживаться правил соответствующей Инструкции о порядке работы с инфекционным материалом и микроорганизмами II и III групп патогенности. Работу с клиническими изолятами проводят в ламинарном шкафу класса 2 (с защитой исследователя) с использованием соответствующих средств индивидуальной защиты (маска, перчатки и т.п.).
- 5.4. Подготовку реакционной смеси для проведения ПЦР следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света. Закрытый бокс должен обеспечивать создание локальной чистой зоны, необходимой для подготовки ПЦР-смеси.
- 5.5. По окончании работы использованные материалы и рабочее место должны быть соответствующим образом продезинфицированы.
- 5.6. Лизис культур клеток и выделение ДНК, подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР, внесение ДНК-матрицы и проведение ПЦР, гибридизация и отмывка на биочипах должны проводиться в разных изолированных помещениях. Допускается совмещение зон выделения ДНК и внесения ДНК-матрицы при использовании отдельных боксов. Перечень оборудования и расходных материалов, необходимых для анализа с использованием набора СПОЛИГО-БИОЧИП, приведен в Приложении 1.
- 5.7. Запрещается перемещать из одного лабораторного помещения в другое любое лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторную посуду, рабочие растворы и др. Для переноса пробирок используют специально выделенные для этой цели (только для транспортировки) штативы.

- 5.8. Помещение, в котором осуществляются процедуры гибридизации и отмывки на биочипах, должно содержать отдельный комплект одноразовых халатов, головных уборов и перчаток, который по окончании работ необходимо сменить.
- 5.9. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводят ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом. Желательна также обработка поверхностей и отработанных наконечников автоматических пипеток 0,1N раствором соляной кислоты, в присутствии которой гидролиз ДНК происходит эффективнее.
- 5.10. Химическая посуда, пипетки, оборудование, которые используют в работе с набором, должны иметь соответствующую маркировку и храниться отдельно.

6. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

Для получения точного профиля сполиготипирования для анализа рекомендуется использовать образцы ДНК, выделенные из клинических изолятов. При анализе клинического материала (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, экссудат, содержимое холодных абсцессов) в силу вероятного присутствия смешанных популяций штаммов возможно получение неинтерпретируемой гибридизационной картины.

6.1. Обработка образцов мокроты и выделение ДНК (с использованием Комплекта № 1).

- 6.1.1. Приготовление рабочего раствора для обработки мокроты.
К содержимому флакона Деконт-Б добавить содержимое пробирки Деконт-А. Тщательно перемешать до полного растворения. Раствор готовят непосредственно перед употреблением, срок хранения приготовленного раствора - 8 ч.
- 6.1.2. Приготовление промывочного буфера ПБ-1.
Перенести количественно содержимое флакона ПБ-1 в колбу объемом 1000 мл, довести объем дистиллированной водой до 1000 мл и тщательно перемешать. Приготовленный раствор хранить при температуре +2-8°C не более 1 мес.
- 6.1.3. К 2-5 мл мокроты добавить равный объем (2-5 мл) свежеприготовленного рабочего раствора для обработки мокроты (см п. 6.1.1). Перемешать на вортексе в течение 15-20 с.
- 6.1.4. Смесь инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре (+18-25°C), периодически перемешивая на вортексе.
- 6.1.5. После окончания инкубации добавить к смеси 5 объемов ПБ-1 (20-50 мл) и перемешать на вортексе в течение 15-20 с.
- 6.1.6. Центрифугировать в течение 30 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость удалить.
- 6.1.7. Осадок клеток (200-500 мкл) перенести пипеткой в пластиковую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл (далее пробирка типа Эппендорф).
- 6.1.8. Добавить к суспензии клеток равный объем промывочного буфера ПБ-1 и перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 6.1.9. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), надосадочную жидкость удалить: аккуратно слить в банку с дезинфектантом.
- 6.1.10. Добавить к осадку 100 мкл буфера ПБ-2 и перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 6.1.11. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость удалить.
- 6.1.12. Повторить пункты 6.1.8-6.1.9. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром.

- 6.1.13. Добавить к осадку 30 мкл лизирующего буфера ЛБ. Перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 6.1.14. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95°C, после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
- 6.1.15. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре.
- 6.1.16. Перенести надосадочную жидкость, содержащую ДНК, в отдельную маркированную пробирку, плотно закрыть крышку. Хранить образцы ДНК при -20°C не более 6 мес.

6.2. Обработка изолятов и выделение ДНК (с использованием Комплекта № 1)*.

6.2.1 **Методика выделения ДНК из культуры, полученной с жидкой питательной среды**

- 6.2.1.1. 500-1000мкл жидкой среды перенести в пробирку 1,5 мл типа эппендорф.
- 6.2.1.2. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), супернатант удалить.
- 6.2.1.3. К осадку добавить 30 мкл лизирующего буфера **ЛБ** перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 6.2.1.4. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95°C, после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
- 6.2.1.5. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре.
- 6.2.1.6. Перенести надосадочную жидкость, содержащую ДНК, в отдельную маркированную пробирку, плотно закрыть крышку. Хранить образцы ДНК при -20°C не более 6 мес.

6.2.2 **Методика выделения ДНК из культуры, полученной с плотной питательной среды.**

- 6.2.2.1. Петлёй или лопаточкой 1-2 колонии диаметром 1-2 мм с плотной питательной среды перенести в пробирку 1,5 мл типа эппендорф с 1000 мкл физиологического раствора. Перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 6.2.2.2. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), надосадочную жидкость удалить.
- 6.2.2.3. К осадку добавить 30 мкл лизирующего буфера **ЛБ**, перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 6.2.2.4. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95°C (при недостаточной гомогенизации раствора через каждые 7-8 минут инкубации аккуратно встряхивать на вортексе) после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
- 6.2.2.5. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре.
- 6.2.2.6. Перенести надосадочную жидкость, содержащую ДНК, в отдельную маркированную пробирку, плотно закрыть крышку. Хранить образцы ДНК при -20°C не более 6 мес.

* **Примечание.** Для обработки клинических изолятов микобактерий туберкулезного комплекса и выделения микобактериальной ДНК вместо Комплекта № 1 допускается применение других коммерческих наборов и автоматических роботизированных станций, разрешенных к применению в практике клинико-диагностических лабораторий.

6.3. Приготовление смеси для амплификации и проведение ПЦР (Комплект № 2).

6.3.1. Приготовить и маркировать необходимое количество (N) пробирок типа Эппендорф объемом 0,5 или 0,2 мл для проведения стадии ПЦР. Добавить дополнительные две пробирки для положительного (K+) и отрицательного (K-) контролей и маркировать их.

Рекомендуется постановка положительного (K+) и отрицательного (K-) контролей на каждую серию из 10 анализируемых образцов.

6.3.2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР (Комплект № 2). В стерильную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

MQ	$19,0 \times (N+2)^1$ мкл
ПЦР-буф	$3,0 \times (N+2)$ мкл
дНТФ	$3,0 \times (N+2)$ мкл
ПР-1	$3,0 \times (N+2)$ мкл
Taq	$1,0 \times (N+2)$ мкл
УДГ	$0,3 \times (N+2)$ мкл
<hr/>	
Общий объем	$29 \times (N+2)$ мкл

Например, если количество исследуемых образцов составит 10, то добавляемые объемы реагентов комплекта № 2 будут следующими:

MQ	228 мкл
ПЦР-буф	36 мкл
дНТФ	36 мкл
ПР-1	36 мкл
Taq	12 мкл
УДГ	3,6 мкл

6.3.3. Перемешать полученную реакционную смесь на вортексе и внести по 29 мкл в каждую приготовленную пробирку. Если используется амплификатор без подогрева крышки, в каждую пробирку дополнительно вносят по 2 капли минерального масла ММ (сверху на реакционную смесь).

6.3.4. Внести в контрольные пробирки с реакционной смесью по 1 мкл «K+» и «K-» и закрыть их. Внести в остальные пробирки по 1 мкл раствора ДНК анализируемых образцов (см п. 6.1) и закрыть их. Собрать капли центрифугированием в течение 10 с при 1000g. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром.

6.3.5. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор и провести амплификацию, используя приведенный ниже температурно-временной режим (Таблица 1).

¹(N+2) – N- число анализируемых проб; +2 обозначает увеличение объема с учетом двух контрольных пробирок «K+» и «K-».

Таблица 1. Температурно-временной режим этапа ПЦР.

Шаг программы	Температура	Время инкубации	Количество циклов
1	+95°C (предварительная денатурация ДНК)	5 мин	1
2	+95°C (денатурация ДНК)	40 с	52
	+63°C (отжиг праймеров)	40 с	
	+72°C (достройка праймеров)	40 с	
3	+72°C (завершающая инкубация)	7 мин	1

6.4 Проведение гибридизации (Комплекты № 3 и №4)

- 6.4.1. Внести 7,5 мкл раствора ГБ сразу на чип через одно из двух отверстий, как указано на Рис. 3А. При анализе нескольких образцов внесение ГБ во все биочипы можно делать одним сменным носиком.
- 6.4.2. Внести 22,5 мкл реакционной смеси после стадии ПЦР в то же отверстие, куда был внесен раствор ГБ. При заполнении камеры следует избегать образования воздушных пузырей (правильное заполнение приведено на Рис. 3Б). Если при амплификации использовали минеральное масло (ММ), следует избегать его попадания в наконечник пипетки. Плотно закрыть крышку камеры.

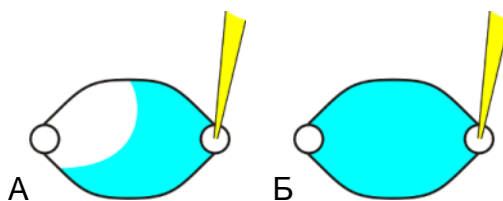


Рисунок 3. Проведение гибридизации.

А – внесение буфера ГБ,

Б – внесение реакционной смеси.

- 6.4.3. Провести гибридизацию в закрытом суховоздушном термостате при +37°C в течение 6-18 часов. Допускается проведение гибридизации в течение ночи с последующей отмывкой биочипов и учетом результатов на следующее утро.
- 6.4.4. Отмывка биочипов по окончании гибридизации.
 Предупреждение. Отмывку биочипов рекомендуется проводить в помещении, оснащенном УФ-лампой с целью предотвращения контаминации ПЦР-продуктами, либо в закрытом ПЦР-боксе, также оснащенном УФ-лампой.
 Для сброса наконечников дозаторов, используемых при отмывке, рекомендуется использовать отдельную емкость с крышкой (спецрезервуар), содержащую раствор, вызывающий деградацию ДНК (0,1N раствор соляной кислоты, 3% раствор хлорамина или аналоги). Все наконечники, используемые на данной стадии, должны быть сброшены в данный резервуар.
- 6.4.4.1. Удалить реакционную смесь через любое из двух отверстий гибридизационной камеры. Замечание. Наконечник содержит раствор с непрогибризованными ПЦР-продуктами. Незамедлительно сбросить данный наконечник в спецрезервуар, содержащий раствор, вызывающий деградацию ДНК.
- 6.4.4.2. Внести в реакционную камеру биочипа 30 мкл дистиллированной воды, прогретой до 37°C. Подождать 1 минуту. Удалить воду. Повторить процедуру. Наконечники сбросить в спецрезервуар.

- 6.4.4.3. Аккуратно отсоединить гибридизационную камеру от подложки биочипа.
- 6.4.4.4. Промыть поверхность биочипа дистиллированной водой над емкостью для отходов, либо над раковиной. Для промывки чипа можно использовать промывалку.
- 6.4.4.5. Высушить биочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки, особенно в зоне гелевых ячеек биочипа, для просушки можно использовать пустую промывалку или медицинскую грушу. Высушенные биочипы хранить в сухом темном месте при комнатной температуре.

6.5. Анализ результатов гибридизации.

- 6.5.1. Результаты гибридизации регистрируют с помощью Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006). Инсталляция и эксплуатация комплекса осуществляется в соответствии с Руководством по эксплуатации Комплекса.
- 6.5.2. Произвести запуск программы «ImaGeWare»®, поставляющейся вместе с комплексом.
- 6.5.3. Программа содержит три вкладки в правой части окна: «Шаблон», «Снимок» и «Отчет».
- 6.5.4. При первом запуске программы выбрать шаблон биочипа, входящего в набор СПОЛИГО-БИОЧИП путем нажатия кнопки «Открыть шаблон» и выбора файла с названием Spoligo-Biochip.tpl с расширением «.tpl». При повторных запусках программа автоматически загружает последний загруженный шаблон и отображает его как показано на Рис.4.

В случае использования нескольких тест-систем на основе биочипов (ТБ-Биочип-1, ТБ-БИОЧИП-2, СПОЛИГО-БИОЧИП), убедиться, что для анализа результатов сполиготипирования на биочипах загружен шаблон с названием Spoligo-biochip.tpl (название отображается в нижней строке диалогового окна «Шаблон» программы Imageware.

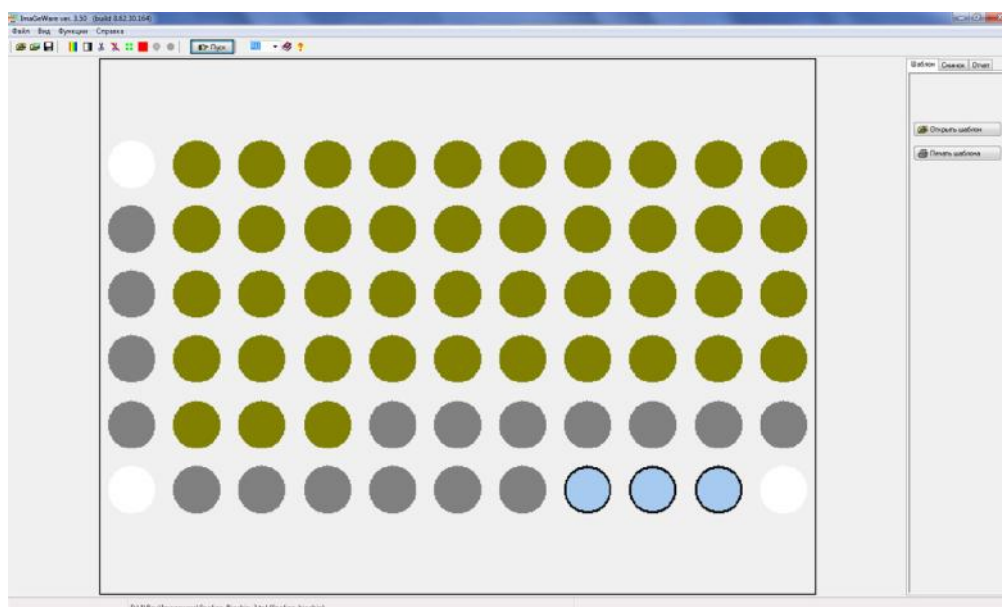


Рисунок 4. Диалоговое окно режима 'Шаблон'. Загружен шаблон, соответствующий биочипу, используемому в наборе СПОЛИГО-БИОЧИП.

При наведении указателя мыши на ячейку выводится информация с обозначением находящегося в ней зонда (spacer NN, N – номер спейсера).

- 6.5.5. Биочип после проведения гибридизации, удаления гибридизационной камеры, ополаскивания и высушивания поместить в приемник Комплекса «лицевой» стороной (содержащей гелевые ячейки) кверху.
- 6.5.6. Анализ флуоресцентной картины гибридизации осуществляется в автоматическом режиме. Для этого следует нажать пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части диалогового окна (Рис. 4). При этом происходит возбуждение флуоресценции ячеек биочипа, получение флуоресцентного изображения (Рис. 5), автоматическое наложение сетки на ячейки биочипа, обсчет сигналов и выдача отчета (Рис. 6).

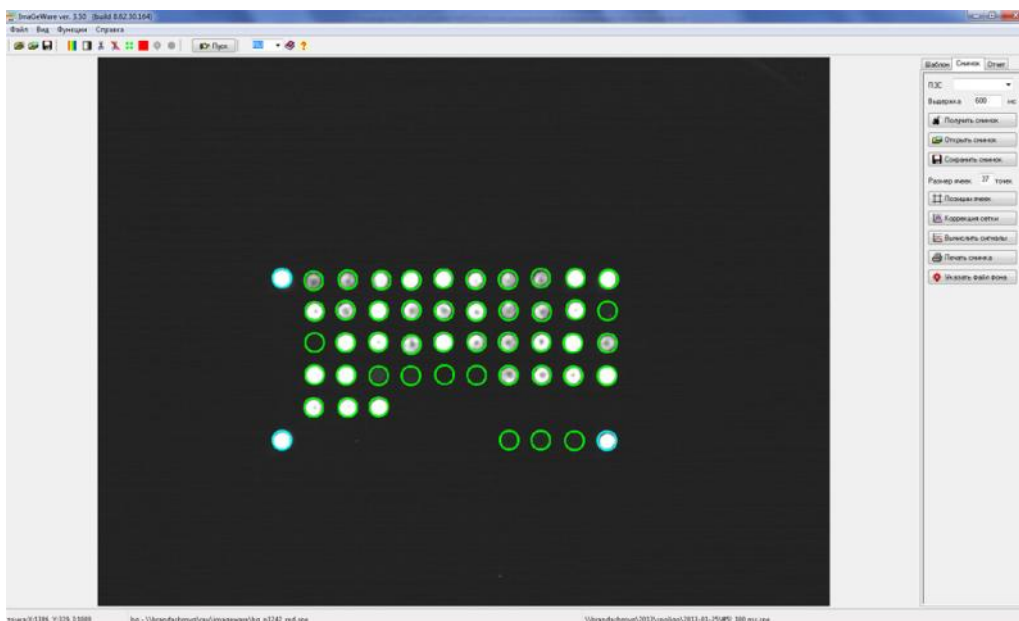


Рисунок 5. Диалоговое окно режима 'Снимок'. Флуоресцентное изображение результата гибридизации на биочипе.

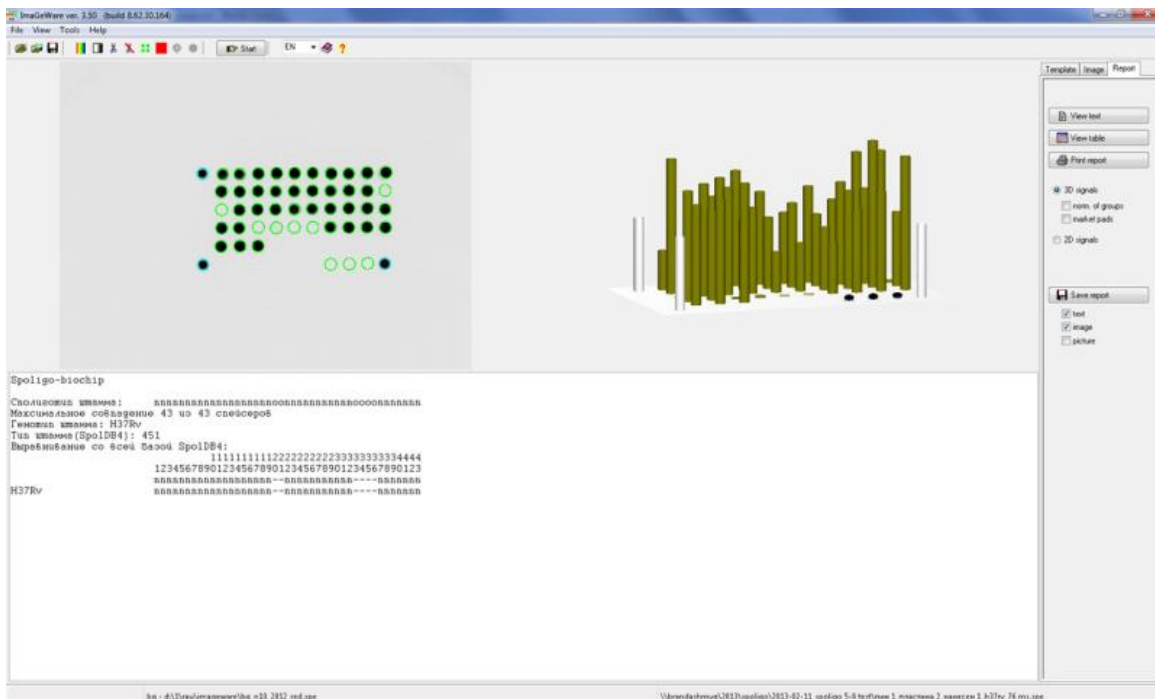


Рисунок 6. Диалоговое окно режима 'Отчет'.

6.5.7. Результат анализа профиля сполиготипирования выдается в следующем формате (Рис. 6):

Spoligo-биочип — название биочипа;								
Сполиготип штамма: <текстовая строка> например:<nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnoooooonnnnnnnnnnn> «n»- спейсер присутствует в анализируемой ДНК, «o»- отсутствует;								
Максимальное совпадение: <NN из NN спейсеров> — проводится сравнение полученного сполиготипа с профилями сполиготипирования базы данных SPOLDB4, встроенной в программное обеспечение Imageware. По результатам поиска ПО находит наиболее близкий вариант сполиготипа и выдает информацию о совпадении количества найденных спейсеров;								
Генотип штамма: <текстовая строка> Тип штамма (SpolDB4): <Значение> В полях «Генотип штамма» и «Тип штамма (SpolDB4)» выдается текстовая информация по генотипу штамма и номер записи в базе SPOLDB4, соответствующий максимально близкому (либо совпадающему) профилю сполиготипа;								
H37Rv <table><tr><td></td><td>1111111111222222222233333333334444</td></tr><tr><td></td><td>1234567890123456789012345678901234567890123</td></tr><tr><td></td><td>nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn</td></tr><tr><td></td><td>nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn</td></tr></table>		1111111111222222222233333333334444		1234567890123456789012345678901234567890123		nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn		nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn
	1111111111222222222233333333334444							
	1234567890123456789012345678901234567890123							
	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn							
	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn							

— выравнивание полученного профиля сполиготипирования с наиболее самым(и) близким(и) референс-профилем(ями), найденными в базе данных SPOLDB4. Обозначения в выравнивании:
Строки 1 и 2 содержат порядковые номера спейсеров.
Строка 3 содержит полученный профиль сполиготипирования
Строка(и) 4 и более содержат референс-профиль(и) сполиготипа(ов) из базы данных с указанием их генотипа(ов). Для удобства визуального восприятия выравнивания отсутствующие спейсеры обозначены символом «-».

6.5.8. Сохранение результатов осуществляется путем нажатия кнопки «Сохранить снимок» в диалоговом окне «Отчет» (Рис. 6). При этом пользователю предлагается выбор форматов сохранения результатов:
— текстовый (файл имеет расширение .txt, в котором прописывается отчет, а также таблица нормированных значений интенсивности сигналов ячеек биочипа);
- снимок (файл имеет расширение .spe, при этом сохраняется необработанная флуоресцентная картина гибридизации на биочипе. Такой формат необходим для дальнейшей обработки гибридизационной картины, вычисления интенсивностей сигналов, получения отчета);
- графический файл (имеет расширение .jpg, при этом сохраняется флуоресцентное изображение биочипа с наложенной сеткой в формате Jpeg. Этот формат удобен для быстрого создания презентаций с использованием полученных данных, однако, он не позволяет проводить обработку флуоресцентного изображения).

Рекомендуемые форматы сохранения при рутинном анализе – «текстовый» и «снимок».

6.5.9. Учет результатов гибридизации.

6.5.9.1. Анализ образца отрицательного контроля.

Анализ результатов гибридизации начинают с биочипа, на котором была прогибридизована реакционная смесь, соответствующая отрицательному контролю амплификации «К-». При анализе данного биочипа с использованием УАПК должно выдаваться сообщение «ДНК микобактерий туберкулеза не обнаружена» (Рис. 7), что означает отсутствие флуоресцентных сигналов (за исключением маркерных элементов) в ячейках биочипа после проведения гибридизации данного образца. Наличие флуоресцентных сигналов в ячейках биочипа, содержащих специфичные зонды, означает контаминацию реакционной смеси продуктами ПЦР, при этом результаты анализа других образцов на биочипах признаются недействительными.

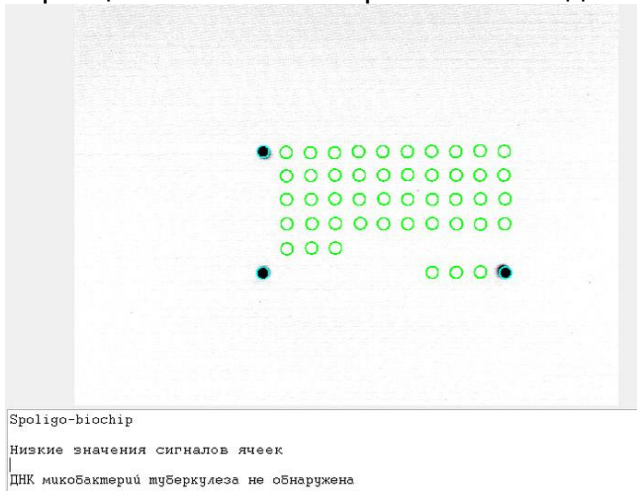


Рисунок 7. Результат анализа образца отрицательного контроля (К-) на биочипе.

6.5.9.2. Анализ образца положительного контроля.

При анализе образца положительного контроля К+, отчет программы должен соответствовать представленному на Рис. 6, при этом должно выводиться сообщение:

```

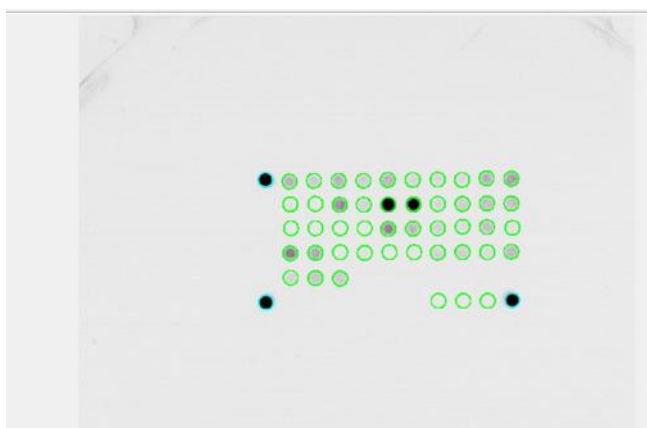
Сполиготип штамма:      nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnooannnnnnnnnnnnoooooannnnnnn
Максимальное совпадение 43 из 43 спейсеров
Генотип штамма:  H37Rv
Тип штамма (SpolDB4):  451
Выравнивание со всей базой SpolDB4:
                                     1111111111222222222233333333334444
12345678901234567890123456789012345678901234567890123
nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn
H37Rv                   nnnnnnnnnnnnnnnnnnn--nnnnnnnnnnnn----nnnnnnnn

```

Если при анализе образца положительного контроля получен результат об ином генотипе, не соответствующем H37Rv, это может означать контаминацию реакционной смеси продуктами ПЦР, при этом результаты анализа на биочипах признаются недействительными.

Отсутствие флуоресцентных сигналов в ячейках биочипа, содержащих зонды, соответствующие спейсерам, присутствующим в геноме штамма H37Rv, означает получение ложноотрицательного результата и свидетельствует о деградации ДНК в пробирке «К+».

6.5.9.3.3. Анализ образца, содержащего ДНК *M.tuberculosis* семейства LAM (LAM9).



```
Spoligo-biochip
Споллиготип штамма:  nnnnnnnnnnooannnnnnnnnoooooannnnnonnoooooannnnnnn
Максимальное совпадение 42 из 43 спейсеров
Генотип штамма: LAM9
Тип штамма (SpolDB4): 252
Выравнивание со всей базой SpolDB4:
                111111111122222222222333333333334444
1234567890123456789012345678901234567890123
nnnnnnnnnn--nnnnnnnn---nnnnn-nn----nnnnnnnn
LAM9          nnnnnnnnnnn--nnnnnnnn---nnnnnnnn---nnnnnnnn
```

Рисунок 10. Результат анализа образца, содержащего ДНК *M.tuberculosis* генотип LAM9.

Отчет содержит следующую информацию:

Споллиготип штамма :	nnnnnnnnnnnooannnnnnnnnoooooannnnnonnoooooannnnnnn
Максимальное совпадение	42 из 43 спейсеров
Генотип штамма :	LAM9
Тип штамма (SpolDB4) :	252
Выравнивание со всей базой SpolDB4 :	
	111111111122222222222333333333334444
	1234567890123456789012345678901234567890123
	nnnnnnnnnn--nnnnnnnn---nnnnn-nn----nnnnnnnn
LAM9	nnnnnnnnnn--nnnnnnnn---nnnnnnnn---nnnnnnnn

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ.

- 7.1. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при следующих условиях:
Комплекты №1 – при температуре +2-8°C.
Комплект № 2 – при температуре -20°C.
Комплекты №№ 3 и 4 – при комнатной температуре (+18-25°C).
- 7.2. Срок годности набора – 6 мес.
- 7.3. Все реагенты после вскрытия флаконов и пробирок могут храниться не более 1 месяца при условиях, указанных в п. 7.1.

По вопросам, касающимся качества набора СПОЛИГО-БИОЧИП, следует обращаться в ООО «БИОЧИП-ИМБ»:
тел. +7(499)394-67-41; e-mail: info@biochip.ru
адрес для переписки: 117312, г. Москва, ул. Вавилова, д.17, пом. Б2

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СПИСОК ОБОРУДОВАНИЯ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ:

(Допускается применение аналогичного оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому).

Зона лизиса культур клеток микобактерий

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	Ламинарный шкаф 2-го класса биологической защиты	СЛШ-1,8 АМ (Миасский завод медицинского оборудования) или БАВп-01–«Ламинар-С» 1,8 (220.180) (Ламинарные системы)	1
2	Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф»	MiniSpin (Eppendorf)	1
3	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) или Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
4	Холодильник (+4°C)		1
5	Термостат твердотельный для пробирок типа «Эппендорф»	Гном (ДНК-Технология)	1
6	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 200-1000мкл	Pipetman P1000G (Gilson) или Лайт 100-1000мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
7	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) или Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
8	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
9	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
10	Штатив настольный для пробирок 1,5-2 мл	RA-7215 (Хеликон)	1
11	Маркеры для пробирок		2
12	Пинцет медицинский		1
<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор СПОЛИГО-Биочип)</i>			
13	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 1000 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-1000 (ULPlast) или SSI-4331-1FS (SSI)	2
14	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) или SSI-4912-1FS (SSI)	2
15	Пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI-1260 (SSI)	1
16	Перчатки латексные, неопудренные		
17	Халаты одноразовые		

Зона подготовки ПЦР-смеси

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	ПЦР-бокс	UVC/T-M-AR (BioSan) или БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) или Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
3	Холодильник -20°С /+4°С		1
4	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 200-1000мкл	Pipetman P1000G (Gilson) или Лайт 100-1000мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
5	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) или Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
6	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 10-100мкл	Pipetman Neo P100N (Gilson) или Лайт 10-100 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
7	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 2-20мкл	Pipetman P20G (Gilson) или Лайт 2-20 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
8	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) или ЛайтМИКРО 1-10 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
9	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
10	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
11	Штатив настольный для пробирок 1,5-2 мл	RA-7215 (Хеликон)	2
12	Штатив настольный для пробирок 0,5 мл	RA-10005 (Хеликон)	2
13	Маркеры для пробирок		2
14	Пинцет медицинский		1
<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор СПОЛИГО-Биочип)</i>			
15	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 1000 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-1000 (ULPlast) или SSI-4331-1FS (SSI)	1
16	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) или SSI-4912-1FS (SSI)	1
17	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 100 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-100 (ULPlast) или SSI-4222-B1FS (SSI)	2
18	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 20 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-020 (ULPlast) или SSI-4222-A1FS (SSI)	2

19	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) или SSI-4112-1FS (SSI)	2
20	Пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI-1260 (SSI)	1
21	Тонкостенные микропробирки 0,5 мл по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI #3320-00 (SSI)	1
22	Перчатки латексные, неопудренные		
23	Халаты одноразовые		

Зона внесения ДНК и проведения ПЦР

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	ПЦР-бокс	UVC/T-M-AR (BioSan) или БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) или Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
3	Многоканальный амплификатор ДНК	Mastercycler Personal (Eppendorf) или Терцик (ДНК-Технология)	1
4	Морозильник -20°С		1
5	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) или ЛайтМИКРО 1-10 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
6	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
7	Штатив настольный для пробирок 0,5 мл	RA-10005 (Хеликон)	1
8	Штатив для хранения пробирок 0,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
9	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
10	Маркеры для пробирок		2
11	Пинцет медицинский		1
<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор СПОЛИГО-Биочип)</i>			
12	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) или SSI-4112-1FS (SSI)	2
13	Тонкостенные микропробирки 0,5 мл по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI #3320-00 (SSI)	1
14	Перчатки латексные, неопудренные		
15	Халаты одноразовые		

Зона проведения гибридизации и отмывки на биочипах

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	ПЦР-бокс	UVC/T-M-AR (BioSan) или БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Термостат суховоздушный, +37°C	ТС-1/20 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»)	1
3	Комплекс универсальный программно-аппаратный (УАПК) для анализа биологических микрочипов	Комплекс универсальный программно- аппаратный (УАПК) для анализа биологических микрочипов по ТУ 9443- 004-02699501-2006, ООО «БИОЧИП- ИМБ»	1
4	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) или Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
5	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 2-20мкл	Pipetman P20G (Gilson) или Лайт 2-20 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
6	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
7	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	
8	Штатив для хранения пробирок 0,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	
9	Штатив настольный для пробирок 1,5-2 мл	RA-7215 (Хеликон)	
10	Штатив настольный для пробирок 0,5 мл	RA-10005 (Хеликон)	
11	Маркеры для пробирок		
12	Банка-промывалка	4.04.01.2620 (ЗАО «НПО Экрос»)	2
13	Интернет-канал пропускной способностью от 33,6 Kbit		
<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор СПОЛИГО-Биочип)</i>			
14	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) или SSI-4912-1FS (SSI)	2
15	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 20 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-020 (ULPlast) или SSI-4222-A1FS (SSI)	2
16	Пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI-1260 (SSI)	1
17	Перчатки латексные, неопудренные		
18	Халаты одноразовые		