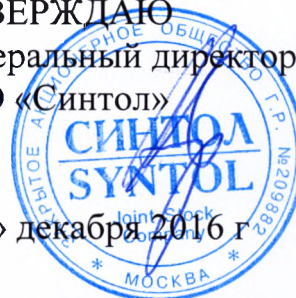


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

«14» декабря 2016 г



А.Кузубов

Медицинское изделие для диагностики ин витро

Набор реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Амплитуб-FQ-PB) по ТУ 9398-003-46395995-2015

ИНСТРУКЦИЯ по применению

2016

1 НАЗНАЧЕНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИН ВИТРО (далее МИ ИВД)

1.1 Полное название

Набор реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Амплитуб-FQ-PB) по ТУ 9398-003-46395995-2015.

1.2 Предназначение МИ ИВД и его диагностическая роль

Набор реагентов «Амплитуб-FQ-PB» предназначен для выявления генных мутаций ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТ) в клиническом материале и образцах биологических культур методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с праймерами, специфичными в отношении фрагментов ДНК гена *gyrA* МБТ, с целью диагностики форм туберкулеза с устойчивостью к фторхинолонам.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования как ускоренного теста лекарственной устойчивости (ЛУ) МБТ при исследовании материала от больного туберкулезом и назначении или коррекции режима химиотерапии с целью повышения вероятности эффективного лечения больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) и сокращения сроков химиотерапии.

1.3 Область применения МИ ИВД

Область применения МИ ИВД – клиническая лабораторная диагностика туберкулеза, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, в лабораториях медицинских организаций, оказывающих специализированную медицинскую помощь по профилю «фтизиатрия», в научно-исследовательских лабораториях и учреждениях.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА МИ ИВД

Компоненты МИ ИВД являются одноразовыми.

Набор реагентов «Амплитуб-FQ-PB» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав МИ ИВД

Набор реагентов состоит из 4 компонентов. В комплект набора входит набор для проведения предварительной мультиплексной ПЦР-PB с целью накопления специфического ДНК фрагмента гена *gyrA* *Mycobacterium tuberculosis* complex.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Набор реагентов «Multi-FQ» для проведения предварительной амплификации в составе:			
	Реакционная смесь в микропробирках, PC Multi -FQ	прозрачная бесцветная жидкость	6 мкл	100 пробирок
	Положительный контрольный образец, ПКО-multi	прозрачная бесцветная жидкость	0,2 мл	1 пробирка
	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,2 мл	1 пробирка
	Раствор для разведения образцов, ddH₂O	прозрачная бесцветная жидкость	5 мл	4 пробирки
2.	Реакционная смесь для исследуемых образцов в стрипованных микропробирках, PC-FQ	прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета	4x6 мкл	96 стрипов
3.	Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы, ПКО1-FQ	прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета	4x11 мкл	12 стрипов
4.	Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы, ПКО2-FQ	прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета	4x11 мкл	12 стрипов

2.2 Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на определение **96 образцов** и включает **120 стрипов**, включая контрольные образцы. Каждый стрип предназначен для анализа 1 образца и содержит **4 пробирки** с раскапанными различными концентрированными реакционными смесями, предназначенными для выявления мутаций в определенных кодонах гена *gyrA*, ответственного за устойчивость к фторхи-

нолонам. Фермент ДНК-полимераза находится в крышке каждой пробирки. Первая пробирка каждого стрипа промаркирована.

2.3. Принцип метода

Выявление генных мутаций ДНК МБТ в определенных кодонах гена *gyrA* МБТ с помощью набора реагентов основано на использовании оригинального метода мультikonкурентной аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени. Метод мультikonкурентной аллель-специфичной ПЦР-РВ сочетает ПЦР-РВ и аллель-специфичную ПЦР (АС-ПЦР).

Аллель-специфичная ПЦР (АС-ПЦР) основана на том положении, что для эффективной ПЦР 3'-концевой нуклеотид праймера должен быть комплементарен соответствующему нуклеотиду ДНК-матрицы, в противном случае эффективность удлинения праймера во время ПЦР резко снижается или может отсутствовать совсем. АС-ПЦР позволяет получать информацию не только о наличии мутации в геномной ДНК, но и ее аллельном распределении.

Мультikonкурентная АС-ПЦР в реальном времени основана на конкурентном встраивании аллель-специфичных праймеров с различными нуклеотидами на 3'-конце.

В реакционной смеси ПЦР-РВ содержатся прямой и обратный праймеры, гибридизационный флуоресцентный зонд, не содержащие мутаций, а также 5'-флуоресцентно-меченные аллель-специфичные праймеры, несущие на 3'-конце определенные нуклеотидные замены, и общий комплементарный аллель-специфичным праймерам 3'-меченный олигонуклеотид-гаситель. Каждый аллель-специфичный праймер со своей нуклеотидной заменой мечен своим флуоресцентным красителем, что позволяет по мере накопления продукта реакции определять его присутствие в исходной ДНК по изменению флуоресценции. В одной пробирке одновременно можно определять до трех точек мутаций (зонд + 3 аллель-специфичных праймера) по числу возможных флуорофоров, одновременно считываемых прибором. *Если анализируемый образец не содержит*

мутаций, то будет идти ПЦР-РВ с прямым и обратным праймерами, не мечеными и не содержащими мутаций, и нарастание флуоресценции будет наблюдаться только по флуорофору гибридизационного зонда. **Если образец содержит мутацию**, то нарастание флуоресценции будет наблюдаться и по флуорофору гибридизационного зонда, и по флуорофору 5'-флуоресцентно-меченного аллель-специфичного праймера, который будет встраиваться вместо обычного праймера, не содержащего мутаций.

Гибридизационный флуоресцентный зонд, не содержащий мутаций, является маркером присутствия искомого специфического фрагмента и играет роль внутреннего контроля, контролируя возможное ингибирование реакции в целом.

Постановка ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), «CFX-96» («BioRad», США), или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Фторхинолоны действуют путем ингибирования топоизомераз II типа. В микобактериях туберкулеза мишенью действия фторхинолонов является ДНК-гираза – тетрамерный белок, состоящий из двух субъединиц, кодируемых генами *gyrA* и *gyrB*. Основные мутации, приводящие к устойчивости МБТ к фторхинолонам, содержатся на участке гена *gyrA*. Набор реагентов «Амплитуб-FQ-РВ» определяет 6 различных наиболее часто встречаемых мутаций в кодонах 90, 91 и 94 гена *gyrA* МБТ (таблица 1 в п. 6 настоящей инструкции).

По каналу **Cy5** детектируется гибридизационный флуоресцентный зонд, определяющий наличие в образце генного локуса *gyrA* МБТ. По каналам **FAM**, **R6G(HEX)** и **ROX** определяется наличие мутаций гена *gyrA* МБТ.

Положительный результат теста означает, что исследуемый образец ДНК содержит мутации в генах микобактерий туберкулеза, определяющих устойчивость к фторхинолонам. Отрицательный результат теста означает, что в исследуемом образце ДНК не обнаружено мутаций, определяемых данным набором.

2.4 Ограничения метода

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР-РВ и/или недостаточное количество ДНК в исследуемой пробе. Это может быть вызвано некачественной предобработкой биологического материала и/или недостаточной эффективностью выделения ДНК. Поэтому, для экстракции ДНК и последующего ПЦР-РВ-анализа с целью обнаружения МБТ следует использовать наборы реагентов, содержащие контролирующие компоненты, проходящие все этапы анализа. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью специфического зонда, контролирующего наличие генного локуса *gyrA* МБТ, в котором могут содержаться мутации.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базах ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России (г. Москва) и ЗАО Синтол (г. Москва) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность – не более 2 копий ДНК в микролитре пробы (копий·мкл⁻¹).

3.1.2 Специфичность

Специфичность набора реагентов составляет 99-100%.

Специфичность положительных контрольных образцов, используемых в МИ ИВД и имеющих определенные замены в *gyrA* генном локусе МБТ, подтверждена методом секвенирования по Сенгеру на приборе ABI Prizm 3130x1 с помощью набора «BigDye Seq.Kit» v.3.1. (Life Technology, США).

При проведении исследований наблюдалась полная внутривариационная, межвариационная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические исследования набора проведены на базе ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (Москва).

3.2.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - при клинических испытаниях МИ «Амплитуб-*FQ-PB*» на 110 образцах диагностического материала с "истинной" устойчивостью к фторхинолонам был получен положительный результат на наличие мутаций в гене *gyrA* у 104 проб из 110 заведомо устойчивых (94,6%).

При клинических испытаниях МИ «Амплитуб-*FQ-PB*» на 110 образцах культур МБТ с "истинной" устойчивостью к фторхинолонам был получен положительный результат на наличие мутаций в гене *gyrA* у 104 проб из 110 заведомо устойчивых (94,6%).

Суммарно - при клинических испытаниях МИ «Амплитуб-*FQ-PB*» на 220 пробах с "истинной" устойчивостью к фторхинолонам (110 образцов диагностического материала и 110 культур МБТ) был получен положительный результат на наличие мутаций в гене *gyrA* у 208 проб из 220 заведомо устойчивых. Диагностическая чувствительность - не менее 92,5% с доверительной вероятностью 90%.

3.2.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - при клинических испытаниях МИ «Амплитуб-*FQ-PB*» на 125 образцах диагностического материала был получен отрицательный результат на наличие мутаций в гене *gyrA* у 123 проб из 125 заведомо чувствительных (98,4%).

При клинических испытаниях МИ «Амплитуб-*FQ-PB*» на 125 образцах культур МБТ был получен отрицательный результат на наличие мутаций в гене *gyrA* у 123 проб из 125 заведомо чувствительных (98,4%).

Суммарно - при клинических испытаниях МИ «Амплитуб-*FQ-PB*» на 250 пробах с "истинной" чувствительностью к фторхинолонам (125 образцов диагностического материала и 125 культур МБТ) был получен отрицательный результат на наличие мутаций в гене *gyrA* у 246 проб из 250 заведомо

чувствительных. Диагностическая специфичность - не менее 97% с доверительной вероятностью 90%.

Правильность определения наличия/отсутствия мутаций и специфичность изменения нуклеотидной последовательности подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру.

При проведении исследований наблюдалась полная внутривариационная, межвариационная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 (с дополнением СП 1.3.2518-09) «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», СП 3.1.2.3114-13 «Профилактика туберкулеза», Приказа МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации», Приказа МЗ РФ № 951 от 29 декабря 2014 г. «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».

Потенциальный риск применения МИ ИВД – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н). Исследования материала на наличие микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР-РВ, а также определение лекарственной устойчивости МБТ молекулярно-генетическими методами проводят в учреждениях, имеющих разрешение на работу с возбудителями III-IV группы патогенности. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и

проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

4.1 Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшего подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты МИ ИВД в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов МИ ИВД промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов МИ ИВД реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

Спецификации по безопасности предоставляются по запросу.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании МИ ИВД реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних

электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании МИ ИВД реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям **FAM**, **R6G(HEX)**, **ROX**, **Cy5** (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}}$ (№1 – 490нм/520нм, №2 – 525нм/550нм, №3 – 550нм/580нм, №4 – 630нм/665нм), например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96».

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г.Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 10-100 мкл и 20-200 мкл;

штатив-карусель для данных пипеток.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»);

микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903»);
штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ЗАО Синтол);
холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов)
морозильник на -20 °С (для хранения реактивов)

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав МИ ИВД

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с
аэрозольным барьером до 200 мкл;

набор реагентов для выделения ДНК МБТ;

набор реагентов для выявления ДНК МБТ;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ МУТАЦИИ И ПРОБЫ

Кодоны и генные мутации *gyrA* локуса, тестируемые с помощью МИ ИВД, представлены в табл. 1.

Таблица 1.

№ проб-ки в стрипе	Кодоны	Мутации, определяемые в каждой пробирке		Красители	
		замена	обозн-е	мутации	контрольный зонд
1	gyrA90	Ala – Val GCG – GTG	Alm5	ROX	Cy5
2	gyrA91	Ser – Pro TCG – CCG	Alm6	FAM	Cy5
3	gyrA94	Asp – Asn GAC – AAC	Alm1	ROX	Cy5
		Asp – Tyr GAC – TAC	Alm4	FAM	
4	gyrA94	Asp – Gly GAC – GGC	Alm2	R6G(HEX)	Cy5
		Asp – Ala GAC – GCC	Alm3	ROX	

При использовании МИ ИВД «Амплитуб-FQ-PB» в качестве анализируемой пробы может быть любой образец ДНК МБТ с содержанием клеток МБТ не менее 2 м.к./мкл.

ДНК МБТ может быть получена экстракцией из любого клинического материала, предназначенного для анализа микобактерий туберкулеза, деконтаминированных осадков, полученных в результате стандартных процедур пробоподготовки при микробиологических исследованиях (Приказ №109 Минздрава РФ от 21 марта 2003 г., приложение 11), образцов культур. Выделенные образцы ДНК должны быть проанализированы молекулярно-генетическими методами с целью выявления генетических маркеров, специфичных для МБТ и определяющих наличие МБТ в образце. Для получения образца ДНК и выявления МБТ в образце ДНК могут быть использованы любые наборы реагентов, предназначенные для этих целей и зарегистрированные в РФ (например, набор реагентов «Амплитуб-PB» (ЗАО, Синтол).

В соответствии с Приказом МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» клиническим материалом для исследований служит: мокрота и отделяемое верхних дыхательных путей (пробы со слизью), промывные воды бронхов (ПВБ), бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ), биоптаты, аспират из бронхов, экссудат, пунктат, промывные воды желудка, моча, плевральная жидкость, спинномозговая жидкость, перикардальная жидкость, синовиальная жидкость, асцитическая жидкость, гной и гнойно-некротические массы, отделяемое половых путей, менструальная кровь, секционный материал.

6.1 Условия хранения анализируемых проб (образцов ДНК)

Раствор ДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выявление генных мутаций ДНК МБТ, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, набором «АмплиТуб-FQ-PB» включает 2 этапа:

- проведение предварительной ПЦР-PB;
- определение генных мутаций в определенных кодонах генного локуса *gyrA* МБТ.

7.1 Постановка комплекта «Multi-FQ»

Проведение предварительной ПЦР-PB с помощью комплекта «Multi-FQ» – первый этап анализа образцов, содержащих МБТ и отобранных по количественному содержанию клеток МБТ для определения лекарственной устойчивости к фторхинолонам. Предварительная амплификация проводится с целью накопления специфического локуса гена *gyrA* МБТ, ассоциированного с устойчивостью к фторхинолонам.

С целью предотвращения контаминации режим амплификации мультиплексной ПЦР-PB специально включает только **20 циклов**, когда рост флуоресценции обычно еще не регистрируется прибором. Поэтому **ПКО-multi** является только внешним контролем работы реагентов. Пробирку с **ПКО-multi** после окончания реакции амплификации утилизируют.

Для проведения ПЦР-PB «Multi-FQ»:

- Отбирают необходимое количество пробирок с реакционной смесью **PC Multi-FQ** для амплификации из расчета $N+2$, где N - количество исследуемых образцов.
- После размораживания пробирки с реакционной смесью, **PC Multi-FQ**, центрифугируют в течение 30 секунд при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ на микроцентрифуге с использованием ротора для пробирок 0,2 мл для сброса фермента с крышек пробирок.
- Помещают пробирки с реакционной смесью, **PC Multi-FQ**, в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки.

- Используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в микропробирки согласно их маркировке по **19 мкл** ОКО и исследуемых образцов, закрывают крышки данных микропробирок.
- Вносят в микропробирку с маркировкой ПКО **19 мкл ПКО-Multi**, закрывают крышку микропробирки.
- Перемешивают содержимое микропробирок на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют 10-30 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Помещают микропробирки в прибор для ПЦР-РВ и прикатывают крышки микропробирок.
- Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Согласно таблице 2 в диалоговом интерфейсе программы прибора задают параметры температурно-временного режима ПЦР-РВ и используемый краситель **ROX**.

Таблица 2

№ п/п	Температурно-временной режим	Регистрация сигнала	Число циклов
1	95 °С – 300 секунд	–	1
2	62 °С – 40 секунд	ROX	20
3	95 °С – 20 секунд	–	

- Вводят сведения об образцах (при использовании прибора «АНК-32 (32М, 48)» или «CFX96» ввод сведений об образцах возможен после запуска программы амплификации), закрывают крышку прибора, запускают реакцию ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора; расчетное время анализа составляет около 1 часа.
- По окончании реакции микропробирки с **ПКО-multi** и **ОКО** утилизируют, а амплификаты исследуемых образцов разводят в 9 раз раствором для разведения образцов или деионизированной водой (**200 мкл** раствора на один образец). Содержимое микропробирок кратковременно перемешивают на вортексе и центрифугируют 10-30 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Раз-

бавленные амплификаты образцов являются исходными образцами для следующего этапа анализа при определении мутаций.

Учет результатов ПЦР-РВ «Multi-FQ».

Оценку результатов предварительной амплификации проводят с помощью программного обеспечения (ПО) приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96» или эквивалентных им (см. п. 5.1 настоящей инструкции). Критерием регистрации роста сигнала флуоресценции (наличие кинетической кривой роста сигнала флуоресценции) в ПО приборов является величина порогового цикла C_t , которая означает любую величину менее 20. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается ПО прибора, например, как предельная величина порогового цикла ($C_t \geq 20$ в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы «BioRad») и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Для всех исследуемых образцов рост сигнала флуоресценции после реакции предварительной амплификации «Multi-FQ» не регистрируется, т.е. величина порогового цикла $C_t \geq 20$ или N/A. Достоверность предварительной амплификации «Multi-FQ» оценивают по результату амплификации ПКО-multi и ОКО.

Результаты «Multi-FQ» являются недостоверными:

- в случае отсутствия регистрации прибором роста сигнала в пробирке ПКО-multi по каналу **ROX** (ложноотрицательный результат);
- в случае регистрации прибором роста сигнала в пробирке ОКО по каналу **ROX** с величиной порогового цикла $C_t < 20$.

Результаты «Multi-FQ» являются достоверными:

- в случае регистрации прибором роста сигнала в пробирке ПКО-multi по каналу **ROX** с величиной порогового цикла $C_t < 16$;
- в случае отсутствия регистрации прибором роста сигнала в пробирке ОКО по каналу **ROX** с величиной порогового цикла $C_t \geq 20$ (N/A);

Если результаты реакции «Multi-FQ» по ПКО-multi и ОКО при первой постановке были достоверными, то в дальнейшем при использовании вскрыто-

го набора допускается постановка реакции «Multi-FQ» без ПКО-multi и ОКО. Однако, рекомендуется включать ПКО-multi и ОКО в каждую 3-5 постановку.

В случае получения недостоверного результата «Multi-FQ» по ПКО-multi и ОКО все результаты исследуемых образцов признаются недостоверными. В этом случае необходимо повторить этот этап анализа.

7.2 Определение генных мутаций в *gyrA* локусе МБТ

7.2.1 Постановка и выбор контролей

В каждую постановку рекомендуется включить как минимум **1 контрольный стрип**. Для постановки можно выбрать контрольный стрип по **1 варианту ПКО1-FQ** или по **2 варианту ПКО2-FQ** , включенные в набор (таблица 3).

Таблица 3

№ пробки в стрипе	Реакционные смеси	Рекомендуемые возможные варианты постановки контролей		Мутации в каждой пробирке	Красители	
		1 вариант	2 вариант		мутации	контрольный зонд
1	gyrA90	ПКО-Alm5	ПКО-Alm5	Alm5	ROX	Cy5
2	gyrA91	ПКО-Alm6	ПКО-Alm6	Alm6	FAM	Cy5
3	gyrA94-1	ПКО-Alm1		Alm1	ROX	Cy5
			ПКО-Alm4	Alm4	FAM	
4	gyrA94-2	ПКО-Alm2		Alm2	R6G(HEX)	Cy5
			ПКО-Alm3	Alm3	ROX	

7.2.2 Подготовка и проведение ПЦР-РВ

— Отбирают необходимое количество стрипов с концентрированной реакционной смесью **РС-FQ** для амплификации исследуемых образцов **N** (1 стрип – 1 образец), где **N** - количество исследуемых образцов, и **1 контрольный стрип** с концентрированной реакционной смесью, содержащей контрольные образцы (**ПКО1-FQ** или **ПКО2-FQ**).

*Примечание: Общее количество пробирок не должно превышать размер реакционного модуля используемого амплификатора. Например, максимальная загрузка для 96-луночного прибора составляет 24 стрипа (23 образца + 1 ПКО), для 48-луночного прибора – 12 стрипов (11 образцов + 1 ПКО), для 32-луночного прибора – 8 стрипов (7 образцов + 1 ПКО).

- После размораживания пробирки с реакционной смесью центрифугируют 30 секунд при 3000 об·мин⁻¹ на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл для сброса фермента с крышек пробирок.
- Помещают стрипы с реакционной смесью в штатив в соответствии с маркировкой **1-ой пробирки**. Маркируют стрипы в соответствии с протоколом исследования.
- Исследуемые образцы (**разведенные амплификаты**) после проведения предварительной реакции «Multi-FQ» перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют 3-5 секунд при 3000 об·мин⁻¹ на микроцентрифуге для сброса капель.
- Вносят в микропробирки **контрольного стрипа** (на стенку каждой пробирки) по **14 мкл** деионизированной воды, используя наконечники с аэрозольным барьером.
- Вносят образцы в стрипы с реакционной смесью для исследуемых образцов из расчета **1 стрип – 1 образец**. Один исследуемый образец вносится в каждую пробирку стрипа (на стенку пробирки) по **19 мкл**, начиная с 1-й промаркированной пробирки.
- Содержимое стрипованных пробирок кратковременно перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют 10-30 секунд при 3000 об·мин⁻¹ на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл.
- Помещают микропробирки в прибор для ПЦР-РВ в соответствии с рекомендуемым порядком установки в прибор (рис. 1) и прикатывают крышки микропробирок.

К	1	2	3	4	5	6	7
К	1	2	3	4	5	6	7
К	1	2	3	4	5	6	7
К	1	2	3	4	5	6	7

АНК-32

К	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
К	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
К	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
К	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23

CFX-96

Рисунок 1. Порядок расположения стрипованных микропробирок в амплификаторах: К – контрольный стрип; 1, 2, 3... – стрипы с образцами.

— Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Согласно таблице 4 в диалоговом интерфейсе программы прибора задают параметры температурно-временного режима ПЦР-РВ и вводят красители **FAM**, **R6G(HEX)**, **ROX** и **Cy5**.

Таблица 4

№ п/п	Температурно-временной режим	Регистрация сигнала	Число циклов
1	95 °С – 300 секунд	—	1
2	95 °С – 20 секунд		40
3	67 °С – 20 секунд		
4	65 °С – 30 секунд	FAM, R6G(HEX), ROX,Cy5	

— Вводят сведения об образцах (при использовании прибора «АНК-32 (32М, 48)» или «CFX96» ввод сведений об образцах возможен после запуска программы амплификации), закрывают крышку прибора, запускают реакцию ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора; расчетное время анализа составляет около 2 часов.

7.2.3 Процедура измерения результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью ПО приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96» или эквивалентных им (см. п. 5.1 настоящей инструкции). Критерием регистрации роста сигнала флуоресценции (наличие кинетической кривой роста сигнала флуоресценции) в ПО приборов

является величина порогового цикла C_t , которая означает любую величину менее 40. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается ПО прибора, например, как предельная величина порогового цикла ($C_t \geq 40$ в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы «BioRad») и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** в случае отсутствия роста сигнала по каналам **FAM**, **R6G(HEX)** и **ROX** свидетельствует о наличии специфического фрагмента гена *gyrA* ДНК МБТ и отсутствии определяемых в данной микропробирке мутаций, при этом пороговый цикл C_t должен быть менее 32,0.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналам **FAM** или **R6G(HEX)**, или **ROX** одновременно с наличием роста сигнала по каналу **Cy5** свидетельствует о наличии генной мутации в определенном кодоне *gyrA* локуса ДНК МБТ в данной микропробирке. При этом разница (ΔC_t) между пороговым циклом для канала **Cy5** (C_t **Cy5**) и пороговым циклом для каналов **FAM** (C_t **FAM**), или **R6G(HEX)** (C_t **R6G(HEX)**), или **ROX** (C_t **ROX**) должна быть не более 5.

7.2.4 Учет результатов анализа

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации прибором роста сигнала в пробирках с **ПКО1-FQ** или **ПКО2-FQ** по одному из каналов на мутации **FAM**, или **R6G(HEX)**, или **ROX** (ложноотрицательный результат) (красители, определяющие мутации в каждой пробирке контрольного стрипа, см. в таблице 3, п.7.2.1 настоящей инструкции);
- в случае отсутствия регистрации прибором роста сигнала по каналу **Cy5** пробирках с **ПКО1-FQ** или **ПКО2-FQ** (недостовверный результат в конкретной микропробирке ПКО);
- в случае регистрации прибором роста сигнала по каналу **Cy5** с величиной порогового цикла $C_t \geq 32,0$ или отсутствия регистрации роста сигнала по ка-

налу **Cy5** в какой-либо из 4-х пробирок стрипа для исследуемого образца (ложноотрицательный результат для конкретного исследуемого образца).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае регистрации прибором роста сигнала в пробирках с **ПКО1-FQ** или **ПКО2-FQ** по одному из каналов на мутации **FAM**, или **R6G(HEX)**, или **ROX** (красители, определяющие мутации в каждой пробирке контрольного стрипа, см. в таблице 3, п.7.2.1 настоящей инструкции) одновременно с наличием сигнала по каналу **Cy5**;
- в случае регистрации прибором роста сигнала во всех 4-х пробирках стрипа с исследуемым образцом по каналу **Cy5** с величиной порогового цикла $Ct \leq 32,0$.

7.2.5 Интерпретация результатов анализа

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно принципу используемого метода мультиконкурентной АС-ПЦР в реальном времени (см. п. 2.3 настоящей инструкции). Результат анализа оценивают отдельно для каждого стрипа, начиная с первой пробирки. Рекомендуется проводить оценку результата в режиме одновременного просмотра каналов детекции прибора, если эта функция имеется в используемом ПО прибора.

Интерпретация результатов ПЦР-РВ положительных контрольных образцов (ПКО1-FQ, ПКО2-FQ)

Интерпретацию результатов ПЦР-РВ положительных контрольных образцов (**ПКО1-FQ**, **ПКО2-FQ**) проводят согласно таблицам 3 (п.7.2.1 настоящей инструкции), 5 и карте интерпретации результатов анализа мутаций (рис. 2).

В каждой пробирке контрольного стрипа должен наблюдаться рост сигнала флуоресценции одновременно по каналу **Cy5** и по одному из каналов на мутации **FAM** или **R6G(HEX)**, или **ROX**. При этом разница (ΔCt) между пороговым циклом для канала **Cy5** и пороговым циклом для каналов **FAM**, или **R6G(HEX)**, или **ROX** должна быть не более 5: $\Delta Ct \leq 5$; $\Delta Ct = |Ct_{Cy5} - [Ct_{FAM}, Ct_{R6G(HEX)}, Ct_{ROX}]|$.

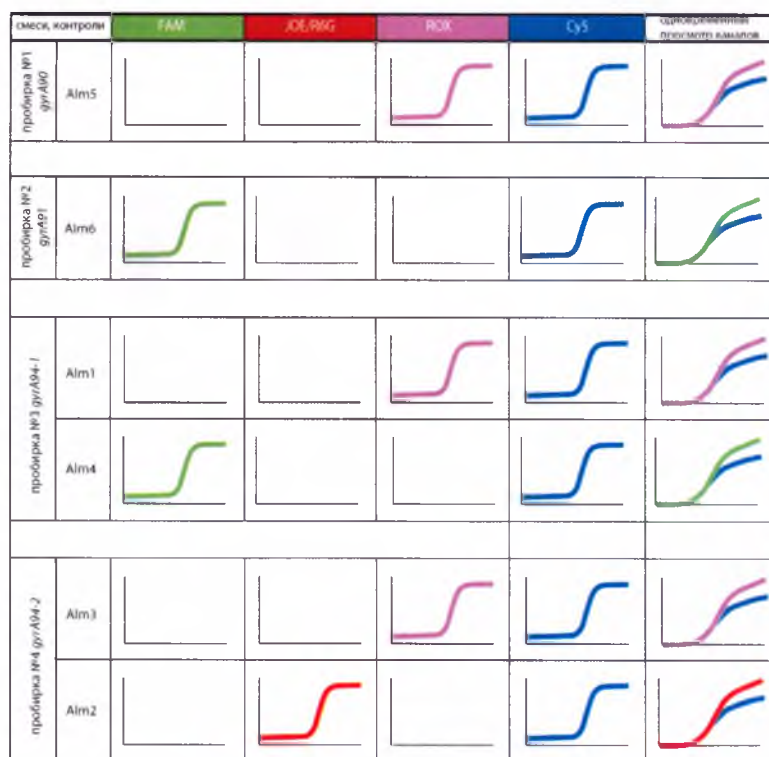


Рисунок 2. Карта интерпретации результатов анализа мутаций.

Таблица 5

Обра- зец	Про- бирка стрипа	Результат ПЦР-РВ по каналу флуоресценции					Интерпретация результата
		FAM	R6G (HEX)	ROX	Cy5	ΔCt	
		Alm4, Alm6	Alm2	Alm1, Alm3, Alm5	gyrA локус		
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретного ПКО							
ПКО	Любая из 4-х	–	–	–	–		Ложноотрицательный резуль- тат, ингибирование ПЦР-РВ
ПКО	Любая из 4-х	–	–	–	+		Недостовверный результат
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретного ПКО в стрипе ПКО1-FQ							
ПКО- Alm5	1	–	–	+	+	ΔCt>5	Недостовверный результат
ПКО- Alm6	2	+	–	–			
ПКО- Alm1	3	–	–	+			
ПКО- Alm2	4	–	+	–			
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретного ПКО в стрипе ПКО2-FQ							
ПКО- Alm5	1	–	–	+	+	ΔCt>5	Недостовверный результат
ПКО- Alm6	2	+	–	–			
ПКО- Alm4	3	+	–	–			
ПКО- Alm3	4	–	–	+			
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов для ПКО1-FQ							
ПКО- Alm5	1	–	–	+	+	ΔCt≤5	Результат по ПКО достоверен, мутация Ala – Val gyrA90
ПКО- Alm6	2	+	–	–			Результат по ПКО достоверен, мутация Ser – Pro gyrA91
ПКО- Alm1	3	–	–	+			Результат по ПКО достоверен, мутация Asp – Asn gyrA94
ПКО- Alm2	4	–	+	–			Результат по ПКО достоверен, мутация Asp – Gly gyrA94
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов для ПКО2-FQ							
ПКО- Alm5	1	–	–	+	+	ΔCt≤5	Результат по ПКО достоверен, мутация Ala – Val gyrA90
ПКО- Alm6	2	+	–	–			Результат по ПКО достоверен, мутация Ser – Pro gyrA91
ПКО- Alm4	3	+	–	–			Результат по ПКО достоверен, мутация Asp – Tyr gyrA94
ПКО- Alm3	4	–	–	+			Результат по ПКО достоверен, мутация Asp – Ala gyrA94

Таблица 6

Пробирка стрипа	Результат ПЦР-РВ по каналу флуоресценции					Интерпретация результата
	FAM	R6G	ROX	Cy5	ΔCt	
	Alm4, Alm6	Alm2	Alm1, Alm3, Alm5	<i>gyrA</i> локус		
Результаты всего анализа не подлежат учёту для конкретного исследуемого образца						
Любая из 4-х	–	–	–	Ct≥32,0		Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ Необходимо повторить анализ данной пробы
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов						
1	–	–	+	Ct≤32,0	ΔCt≤5	Обнаружена мутация МБТ Ala – Val <i>gyrA90</i> , МБТ устойчивы к FQ
	–	–	+		ΔCt>5	Мутации не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
	–	–	–			Мутации не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
2	+	–	–		ΔCt≤5	Обнаружена мутация МБТ Ser – Pro <i>gyrA91</i> , МБТ устойчивы к FQ
	+	–	–		ΔCt>5	Мутации не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
	–	–	–			Мутации не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
3	–	–	+		ΔCt≤5	Обнаружена мутация МБТ Asp – Asn <i>gyrA94</i> , МБТ устойчивы к FQ
	+	–	–			Обнаружена мутация МБТ Asp – Tyr <i>gyrA94</i> , МБТ устойчивы к FQ
	–	–	+		ΔCt>5	Мутаций не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
	+	–	–			Мутаций не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
	–	–	–			Мутаций не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
4	–	+	–		ΔCt≤5	Обнаружена мутация МБТ Asp – Gly <i>gyrA94</i> , МБТ устойчивы к FQ
	–	–	+			Обнаружена мутация МБТ Asp – Ala <i>gyrA94</i> , МБТ устойчивы к FQ
	–	+	–		ΔCt>5	Мутаций не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
	–	–	+			Мутаций не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ
	–	–	–			Мутаций не обнаружено, МБТ чувствительны к FQ

В случае получения недостоверного результата в какой-либо пробирке стрипа для исследуемого образца ($Ct_{Cys} \geq 32,0$) весь анализ для этого образца считается недостоверным. В этом случае необходимо проверить концентрацию ДНК МБТ в исходном образце и возможное наличие ингибиторов (по ПЦР-РВ на обнаружение и количественный анализ МБТ с помощью наборов реагентов, зарегистрированных в РФ). Если образец ДНК соответствует критериям анализируемой пробы для данного МИ ИВД, то необходимо повторить весь анализ, начиная с этапа проведения предварительной ПЦР-РВ с помощью комплекта «Multi-FQ».

8 РАСЧЕТЫ

8.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например программа АНК_Shell версия 60 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М», «АНК-48» или Bio-Rad CFX Manager 2.0 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ МИ ИВД

9.1 Условия хранения МИ ИВД

В соответствии с ТУ 9398-003-46395995-2015 – в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 18 до минус 20 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не должен превышать 5 суток в течение срока годности набора реагентов.

9.2 Условия транспортирования МИ ИВД

Транспортирование МИ ИВД «Амплитуб-FQ-PB» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-003-46395995-2015 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от минус 18 до минус 20 °С. Допускается транспортирование до 5 суток при температуре до плюс 8 °С.

9.3 Срок годности МИ ИВД

Срок годности МИ ИВД составляет 9 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

9.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 (либо специально предназначенное вспомогательное помещение) с целью последующей инактивации (МУ 1.3.2569-09).

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик МИ ИВД требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (9 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество МИ ИВД «Амплитуб-FQ-PB» направлять на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495)984-69-93, факс. (499)977-74-55 E.mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению МИ ИВД, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении МИ ИВД реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.

СОГЛАСОВАНО:

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения Центральный НИИ туберкулеза

проф. А. Эргешов
«14» декабря 2016 г.



УТВЕРЖДАЮ:

Научный директор ЗАО «Синтол»

Я.И. Алексеев
«14» декабря 2016 г.



Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 27 листов



Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.В. Кузубов

Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 27 листов
Директор ФГБНУ «ЦНИИТ»
проф. А. Эргешов

