

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «ЭнДжентикс»

Новоселова Е.А.



«0006»

«ЭнДжентикс»

июня

20 17 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для обнаружения ДНК микобактерий
туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции в режиме
реального времени «Полипроб скрин ТБ»
по ТУ 9398-001-26124018-2015.

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов для обнаружения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Полипроб скрин ТБ» (далее по тексту - Набор реагентов), предназначен для обнаружения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) в клиническом материале (мокроте) и бактериальных культурах, предположительно содержащих ДНК МБТК, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Основные виды микобактерий, относящихся к МБТК и вызывающих туберкулез у человека, определяемые Набором реагентов «Полипроб скрин ТБ»: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*.

Простой и удобный метод определения ДНК МБТК обеспечивает возможность быстрой диагностики туберкулеза и своевременного назначения адекватной антибиотикотерапии.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

2.1. Формы выпуска.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «Полипроб ДНК Преп», «Скрин ТБ ПЦР» и реагент «СтопАктив МТБ-реагент».

Форма 2 включает комплект реагентов «Скрин ТБ ПЦР».

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного анализа, включающего пробоподготовку, выделение ДНК из клинического материала и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Для проведения полного анализа необходимо использовать реагенты для пробоподготовки клинического материала, например, «СтопАктив МТБ-реагент» (ООО «Эн-

Джентикс», Россия), и наборы для выделения ДНК МБТК из клинического материала и культуры МБТК, например, «Полипроб ДНК Преп» (ООО «ЭнДжентикс», Россия).

1.2 Показания.

Необходимость обнаружения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) в клиническом материале (мокроте) и бактериальных культурах, предположительно содержащих ДНК МБТК, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

1.3. Противопоказания.

Отсутствуют

2.2. Состав.

Внимание! В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов. Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

Состав Набора реагентов представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Реагент «СтопАктив МТБ-реагент» включает:

Реагент	Объем	Количество	Описание
СтопАктив МТБ-реагент	1000 мл	1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость

Реагент рассчитан на проведение пробоподготовки 100 образцов.

Комплект реагентов «Полипроб ДНК Преп» включает:

Реагент	Объем	Количество	Описание
Лизирующий буфер	40 мл	1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость
Компонент Т	0,1 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость
ДНК-магнитные частицы	0,8 мл	1 пробирка	Суспензия черного цвета
Отмывочный буфер (x2)	16 мл	1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость
Буфер для элюирования ДНК	1,3 мл	8 пробирок	Прозрачная бесцветная жидкость

Комплект рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов.

Комплект реагентов «Скрин ТБ ПЦР» включает:

Реагент	Объем	Количество	Описание
1. Реагенты для амплификации:			
Тaq-полимераза	0,03 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость
2х смесь скрин	0,4 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость
Внутренний контроль	0,4 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость
Пробирка стрипованная	–	128 шт (16 стрипов по 8 лунок)	Стрипованные пробирки, объем лунок 0,2 мл
Крышка стрипованная	–	128 шт (16 стрипов по 8 крышек)	Стрипованные крышки
2. Контроли:			
К-	0,03 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость
К+	0,03 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость

Комплект рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

2.3. Число анализируемых проб клинического материала.

Комплект реагентов «Скрин ТБ ПЦР» рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контрольные, и позволяет осуществить одновременный анализ от 1 до 94 клинических образцов в одной постановке. Каждая из пробирок с реагентами может быть разморожена только один раз и повторному замораживанию не подлежит. После размораживания реагенты должны быть использованы в течение 3 суток. Так как каждая постановка должна включать, помимо клинических образцов, панель контролей (К+, К-), набор реагентов позволяет осуществить от одной постановки (94 клинических образца одновременно) до 8 постановок (по 10 клинических образцов в каждой, всего 80 клинических образцов). Таким образом, с использованием реагента из каждой пробирки можно провести не более 2 постановок в течение 3 суток.

2.4. Принцип метода.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей

элонгации полинуклеотидных цепей с этих праймеров высокоспецифичным термостабильным ферментом Taq-полимеразой.

Выделение ДНК МБТК из клинического образца (части образца) и бактериальной культуры для проведения анализа на обнаружение ДНК МБТК может осуществляться как ручным способом, так и с применением системы автоматизированной пробоподготовки любым из зарегистрированных на территории Российской Федерации наборов, предназначенных для выделения ДНК МБТК из клинического материала и культуры МБТК, например, «Полипроб ДНК Преп» (ООО «ЭнДжентикс», Россия).

Внимание! В ходе выделения ДНК к каждому клиническому образцу до начала экстракции необходимо внести внутренний контроль, входящий в состав Реагентов для амплификации из расчета 15 мкл на 1 образец.

Мультиплексная ПЦР-РВ проводится на анализаторе для проведения ПЦР с регистрацией результатов в режиме реального времени и состоит из трёх независимых реакций, которые проводятся в одной пробирке одновременно. Результаты амплификации регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды (зонды), содержащие флуоресцентные метки FAM и HEX, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала.

Первая реакция позволяет обнаружить специфический фрагмент ДНК мультикопийной вставки IS6110, который присутствует в большинстве штаммов микобактерий туберкулезного комплекса, но может отсутствовать в геноме *Mycobacterium tuberculosis*. Вторая реакция позволяет обнаружить специфический фрагмент ДНК *regX3*, представленный в геноме микобактерий туберкулезного комплекса одной копией. Для обнаружения ДНК IS6110 и *regX3* используются зонды, меченные красителем FAM. Наличие флуоресцентного сигнала по этому

каналу свидетельствует о наличии в исследуемом образце ДНК МБТК. Использование двух независимых реакций на различные участки генома микобактерий туберкулезного комплекса позволяет увеличить специфичность и надежность проводимого анализа.

Третья реакция позволяет обнаружить специфический фрагмент ДНК внутреннего контроля (IC), тем самым контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца и исключить недостоверные результаты. Для обнаружения ДНК внутреннего контроля используется зонд, меченный красителем HEX. Наличие флуоресцентного сигнала по этому каналу свидетельствует о наличии в исследуемом образце ДНК внутреннего контроля. Наличие флуоресцентного сигнала жля внутреннего контроля в случае отсутствия флуоресцентного сигнала по специфическим реакциям подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в исследуемой пробе. Отсутствие флуоресцентного сигнала по всем трем реакциям свидетельствует об ингибировании ПЦР, что позволяет исключить недостоверный отрицательный результат.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1 Аналитическая чувствительность.

Аналитическая чувствительность Набора реагентов оценивалась с использованием референсного штамма H37Rv (паспорт выдан ФГБУ «НУЭСМП» Минздрава России, источник получения ATCC, № штамма 700403 по протоколу ФГБНУ ЦНИИТ).

Наименьшее число КОЕ МБТК в образцах, для которых было показано достоверное определение результатов чувствительности – 10 КОЕ на 1 мл образца.

3.2 Аналитическая специфичность.

Аналитическая специфичность оценивалась при тестировании референсных штаммов изолятов нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), а так же генетически близкородственных МБТК микроорганизмов и микроорганизмов, являющихся наиболее частыми возбудителями бронхолегочной патологии (нетуберкулезной

этиологии), культур микроорганизмов, часто встречающихся в составе нормальной флоры верхних дыхательных путей, культур микроорганизмов, наиболее часто контаминирующих объекты лабораторной и госпитальной среды (44 штамма 37-ми видов микроорганизмов). Кроме того, предметом для исследования аналитической специфичности явилась ДНК человека, выделенная из буккальных соскобов.

Перечень референтных штаммов и клинических изолятов:

Основные виды микобактерий, относящихся к МБТК и вызывающих туберкулез у человека: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*.

Нетуберкулезные микобактерии: *M. avium*; *M. fortuitum*; *M. gordonae*; *M. intracellulare*; *M. kansasii*; *M. marinum*; *M. paratuberculosis*; *M. phlei*; *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*; *M. xenopi*; *M. ulcerans* *M. gastri*, *M. lentiflavum*, *M. malmoense*, *M. hominis*, *M. liquefaciens* и др.

Другие микроорганизмы: Нокардии (*Nocardia asteroides* BKM Ac-2718T, *Nocardia brasiliensis* BKM Ac-863T, *Nocardia brasiliensis* BKM Ac-864, *Nocardia brevicatena* BKM Ac-936T, *Nocardia carnea* BKM Ac-814T, *Nocardia nova* BKM Ac-1971T, *Nocardia otitidiscaviarum* BKM Ac-869T, *Nocardia transvalensis* BKM Ac-867T), *Corynebacterium*: *Corynebacterium vitae* BKM Ac-2189T, *Streptococcus* *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*: *E. coli* K12, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus clavatus* BKM F-738, *Aspergillus flavus* BKM F-463, *Aspergillus fumigatus* BKM F-753, *Aspergillus niger* BKM F-2039, *Aspergillus oryzae* BKM F-209, *Aspergillus terreus* BKM F-3687, *Aspergillus versicolor* BKM F-299, *Candida glabrata* BKM Y-1481, *Candida krusei* BKM Y-2595T, *Candida rhagii* BKM Y-1520, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* BKM Y-375.

Исследовано 15 различных образцов ДНК человека, выделенной из буккального эпителия.

Исследования показали отсутствие ложноположительных результатов в исследованных образцах видов микроорганизмов и ДНК человека.

3.3. Воспроизводимость.



Результаты выявления ДНК МБТК с использованием Набора реагентов демонстрируют высокую воспроизводимость между постановками в пределах аналитической чувствительности метода.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность Набора реагентов составляет 93,55 %.

Диагностическая специфичность Набора реагентов составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «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» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности»

При работе в лабораториях противотуберкулезных учреждений следует дополнительно руководствоваться требованиями Приказа №109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». (Приложение №11).

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в

отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Класс отходов определяется согласно СанПин 2.1.7.2790-10. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности утилизировать как отходы класса «Г».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. п. «Число анализируемых проб клинического материала»).
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ.

Предобработка исследуемого материала

1. Реагент «СтопАктив МТБ-реагент» (ООО «ЭнДжентикс», Россия).
2. Микроцентрифуга для пробирок типа Эппендорф (вортекс) до 16 тыс. g.
3. Шейкер (ротатор) для пробирок объемом 50 мл.

Выделение ДНК из исследуемого материала

4. Комплект реагентов «Полипроб ДНК Преп» (ООО «ЭнДжентикс», Россия) или другие зарегистрированные на территории Российской Федерации наборы, предназначенных для выделения ДНК МБТК из клинического материала и культуры МБТК .
5. Дополнительные материалы и оборудование для выделения ДНК – согласно инструкции к набору для выделения ДНК.

При использовании комплекта реагентов «Полипроб ДНК Преп»:

6. Этанол (95-100%).
7. Изопропанол.

8. Ламинарный бокс (класс биологической безопасности II тип А или тип В).
9. Магнитный штатив для пробирок типа Эппендорф объемом 1,5 мл.
10. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
11. Вортекс.
12. Холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С.
13. Морозильная камера, поддерживающая температуру не выше минус 20 °С.
14. Автоматические или электронные дозаторы переменного объема.
15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема.
16. Штативы для пробирок и наконечников.
17. Емкость для сброса наконечников.
18. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
20. Дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

Проведение ПЦР-РВ

21. Программируемый амплификатор (термоциклер) для ПЦР CFX96 (BioRad, США), «ДТ-96» (НПО «ДНК-Технология», Россия) или аналогичные по своим функциональным характеристикам. По вопросу использования амплификаторов обратиться к производителю.
22. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) II класса защиты.
23. Вортекс.
24. Холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С.
25. Морозильная камера, поддерживающая температуру не выше минус 20 °С.
26. Автоматические или электронные дозаторы переменного объема.
27. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема.
28. Штативы для пробирок и наконечников.
29. Емкость для сброса наконечников.

30. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки типа Эппендорф объемом 0,5, 1,5 или 2 мл.
31. Конические градуированные пластиковые пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 50 мл.
32. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
33. Дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Для проведения исследований используется следующий материал: клинический материал – мокрота, и бактериальные культуры, предположительно содержащие ДНК МБТК.

6.1. Процедура предобработки материала.

Сбор клинических образцов, получение культур МБТК и комплексная лабораторная диагностика туберкулеза проводятся в соответствии с действующими нормативными и методическими документами, принятыми на территории Российской Федерации.

ПЦР-диагностика с использованием Набора реагентов «Полипроб скрин ТБ» предполагает инаktivацию образца (или части образца) перед проведением анализа. Инаktivация проводится с помощью добавления реагента «СтопАктив МТБ-реагент» (ООО «ЭнДжентикс», Россия) к нативному образцу (части образца), образцу (части образца), обработанному стандартными методами пробоподготовки при микробиологических исследованиях, к суспензии культуры клеток МБТК. **Инаktivированный образец (часть образца) пригоден только для исследования методом ПЦР.**

6.1.1. Предварительная обработка нативных образцов и их инаktivация с помощью Инаktivировующего реагента.

1. Клинический материал объемом 3 мл и более собрать в герметичные стерильные прозрачные контейнеры объемом 20–120 мл, предназначенные для сбора клинического материала.

Далее образец может быть использован для комплексного анализа в соответствии с действующими нормативными и методическими документами, принятыми на территории Российской Федерации.

Перенести нативный образец (часть образца) в коническую градуированную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 50 мл. Эту операцию следует проводить либо полностью ручным способом, либо с использованием орбитального шейкера. Перед переносом необходимо провести разжижение нативного материала. При ручном переносе материала в образец (часть образца) стерильной пастеровской пипеткой внести 2–3 объема СтопАктив МТБ-реагента, пипетировать материал до его разжижения, аккуратно перенести в пробирку объемом 50 мл и довести СтопАктив МТБ-реагентом до объема 20–50 мл (в зависимости от объема образца, до соотношения 1:4). При наличии орбитального шейкера к образцу в контейнере добавить небольшой объем СтопАктив МТБ-реагента (приблизительно 8–12 мл), закрыть крышку, закрепить контейнер на шейкере и перемешать в течение 10 мин. при средней скорости. Скорость перемешивания установить таким образом, чтобы перемешиваемый раствор не заливал крышку контейнера. Затем обработанный образец перенести пастеровской пипеткой в пробирку объемом 50 мл и довести СтопАктив МТБ-реагентом до объема 50 мл.

2. Пробирки с образцами, обработанными СтопАктив МТБ-реагентом, инкубировать при комнатной температуре в течение как минимум 1 часа (но не более 4 суток).

Примечание. Рекомендуется во время инкубации перемешивать образцы на шейкере (ротаторе).

Примечание. Инактивированные образцы стабильны при температуре 20–25 °С в течение 4 суток.

3. После инаktivации пробирки центрифугировать 15 мин при 3000 g.

4. Супернатант немедленно удалить после центрифугирования, используя чистый одноразовый наконечник для каждого образца. Аккуратно ввести наконечник по стенке пробирки, не затрагивая осадок. Остаточный объем супернатанта должен составлять не более 0,5 мл.

Супернатант можно удалить и путем аккуратного декантирования. В этом случае необходимо строго следить, чтобы осадок не был удален во время операции. Если осадок плохо прикреплен ко дну пробирки, удалить супернатант при помощи дозатора с одноразовым наконечником. Остаточный объем супернатанта должен составлять не более 0,5 мл.

6.1.2. Инактивация клинического материала, предварительно обработанного в соответствии со стандартными процедурами пробоподготовки при микробиологических исследованиях.

1. Для анализа взять 0,5 мл деконтаминированного осадка и поместить в пробирку типа Эппендорф объемом 1,5-2 мл.
2. К образцу добавить 0,5 мл СтопАктив МТБ-реагента и перемешать на вортексе.
3. Пробирки с образцами, обработанными СтопАктив МТБ-реагентом, инкубировать при комнатной температуре в течение как минимум 1 часа (но не более 4 суток).

Примечание. Инаktivированные образцы стабильны при температуре 20-25°C в течение 4 суток.

4. После инаktivации центрифугировать пробирки 5 мин при 10000 g.
5. Немедленно после центрифугирования удалить супернатант путем аспирации либо одноразовой пастеровской пипеткой, либо при помощи дозатора с одноразовым наконечником. Остаточный объем супернатанта должен составлять 0,05–0,1 мл.

6.1.3. Инаktivация культуры МБТК.

Осадок суспензии клеток используют для выделения ДНК. Возможно добавление СтопАктив МТБ-реагента в соотношении 1:4 при экспозиции как минимум в течение 1 часа.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

Анализ состоит из следующих этапов:

- выделение ДНК;
- проведение ПЦР-РВ;
- учет и интерпретация результатов.

7.1. Выделение ДНК.

Выделение ДНК МБТК из клинического образца (части образца) и культуры МБТ для проведения анализа на обнаружение МБТ может осуществляться как ручным способом, так и с применением системы автоматизированной пробоподготовки, любым из зарегистрированных на территории Российской Федерации наборов, предназначенных для выделения ДНК МБТК из клинического материала и культуры МБТК, например, «Полипроб ДНК Преп» (ООО «ЭнДжентикс», Россия).

Внимание! На этапе выделения ДНК к каждому клиническому образцу необходимо добавить внутренний контроль, входящий в состав Реагентов для амплификации комплекта реагентов «Скрин ТБ ПЦР», из расчета 15 мкл на один образец.

Порядок работы при использовании комплекта реагентов «Полипроб ДНК Преп»:

1. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок с плотно закрывающей крышкой типа Эппендорф объемом 1,5 мл.
2. Приготовить **рабочий Отмывочный буфер**. Для этого во флакон с 16 мл **Отмывочного буфера (x2)** добавить 8 мл **95-100% этанола** и 8 мл **изопропанола**. Сделать пометку о добавлении этанола и изопропанола на этикетке флакона Отмывочного буфера (x2). **Рабочий Отмывочный буфер** хранится при комнатной температуре в плотно закрытом флаконе.

3. В отдельном флаконе смешать Лизирующий буфер и Компонент Т из расчета **350 мкл Лизирующего буфера** и **3,5 мкл Компонента Т** на каждый образец. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на 1 образец больше.
4. Внести в пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 мл по **250 мкл** подготовленной смеси **Лизирующего буфера и Компонента Т**.
5. Добавить в каждую пробирку со смесью Лизирующего буфера и Компонента Т **15 мкл Внутреннего контроля**.
6. Добавить в каждую пробирку со смесью Лизирующего буфера, Компонента Т и Внутреннего контроля **100 мкл исследуемого образца**, закрыть крышки пробирок.
7. Поместить пробирки в термостат с температурой 70 °С на 30 мин. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.
8. Тщательно перемешать на вортексе пробирку с ДНК-магнитными частицами. Убедиться, что все частицы хорошо перемешаны и отсутствует их осадок на дне пробирки.
9. Добавить в пробирки по **7 мкл ДНК-магнитных частиц**. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 3 сек на высокой скорости.
10. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре, перемешивая содержимое пробирок на вортексе в течение 3 сек 1 раз в минуту.
11. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 2 сек на высокой скорости. Поместить пробирки в магнитный штатив. Разделение фаз произойдет мгновенно.

Примечание. Если магнитные частицы не образуют четкого осадка на стенке пробирки, вортексировать пробирку и быстро поместить ее в магнитный штатив.

12. Не снимая пробирок с магнитного штатива, аккуратно удалить надосадочную жидкость. Отбирать жидкость по противоположной от осадка внутренней стенке пробирки. Использовать дозатор с отдельным наконечником для каждой пробы. При отборе не задевать осадок из частиц на стенке пробирки. Переместить пробирки в обычный штатив

Примечание. Если часть частиц попала в наконечник дозатора, аккуратно выпустить их обратно в пробирку.

13. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл** подготовленной ранее смеси **Лизирующего буфера и Компонента Т**, закрыть крышки.
14. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 2 сек на высокой скорости. Поместить пробирки в магнитный штатив.
15. Не снимая пробирок с магнитного штатива, отобрать надосадочную жидкость и переместить пробирки в обычный штатив.
16. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл** подготовленного ранее **рабочего Отмывочного буфера**, закрыть крышки.
17. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 2 сек на высокой скорости. Поместить пробирки в магнитный штатив.
18. Не снимая пробирок с магнитного штатива, отобрать надосадочную жидкость и переместить пробирки в обычный штатив.
19. Повторить отмывку **рабочим Отмывочным буфером** по пп. 16-18 еще **2 раза** (всего 3 отмывки). В последней отмывке тщательно отобрать всю надосадочную жидкость.
20. Подсушить магнитные частицы, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение 5 мин при комнатной температуре.

Примечание. Не сушить более 20 минут, иначе это снизит выход ДНК.

21. Добавить в пробирки по **100 мкл Буфера для элюирования ДНК**, закрыть крышки и перемешать на вортексе в течение 2 сек на высокой скорости.
22. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5 мин. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 2 сек на высокой скорости.
23. Немедленно поместите пробирки в магнитный штатив.

Примечание. Пробирки должны быть нагреты вплоть до помещения в магнитный штатив, в противном случае выход ДНК снижается.

24. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Не снимая пробирок с магнитного штатива, аккуратно отобрать надосадочную жидкость и перенести ее в новые пробирки.

Раствор очищенной ДНК можно хранить короткое время при температуре +4 °С и более длительно при температуре минус 70 °С.

7.2. Проведение ПЦР-РВ.

Для подробного описания принципов проведения исследований на анализаторах CFX96 и «ДТ-96» обратитесь к инструкциям по использованию данных приборов.

7.2.1. Приготовление реакционной смеси.

1. Определить по схеме приготовления реакционных смесей (таблица 2) количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию амплификации требуется **14 мкл 2х смеси скрин** и **1 мкл Таq-полимеразы**. Смесь готовить на общее число исследуемых образцов и контролей (два контроля: К- и К+) плюс запас на одну реакцию.

Таблица 2. Схема приготовления реакционных смесей.

Количество исследуемых клинических образцов	Количество исследуемых в ПЦР-РВ образцов ¹	Количество реакций амплификации ²	2х смесь скрин, мкл	Таq-полимераза, мкл	Требуемое для исследования количество лунок стрипованных пробирок
1	3	4	56	4	3
10	12	13	182	13	12
22	24	25	350	25	24
46	48	50	700	50	48
94	96	98	1372	98	96

2. Разморозить реагенты для проведения амплификации (2х смесь скрин и контроли К- и К+) при комнатной температуре. После размораживания реагенты можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток, повторно реагенты замораживать запрещается. Аккуратно перемешать на вортексе содержимое пробирок и осадить капли с крышек кратким центрифугированием на вортексе.

¹ количество исследуемых клинических образцов плюс контроли К- и К+

² количество исследуемых образцов плюс контроли К- и К+ плюс запас на одну реакцию. В случае исследования одновременно более 46 клинических образцов, рекомендуется готовить реакционную смесь с запасом на две реакции

Внимание! Таq-полимеразу рекомендуется извлекать из морозильной камеры непосредственно перед приготовлением реакционных смесей. Осадить капли фермента с крышки перед использованием кратковременным центрифугированием на вортексе.

3. Приготовить в отдельной одноразовой пробирке типа Эппендорф реакционную смесь, используя рассчитанное количество 2х смеси скрин и Таq-полимеразы. Аккуратно перемешать на вортексе полученную реакционную смесь и осадить капли с крышки кратким центрифугированием на вортексе. **Внимание!** После внесения Таq-полимеразы готовые реакционные смеси не подлежат хранению, после использования остатки реакционных смесей должны быть утилизированы.

7.2.2. Подготовка к проведению ПЦР-РВ.

1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок для проведения амплификации исследуемых клинических образцов и контролей.

Внимание! Детекция флуоресцентного сигнала амплификатором производится через крышки пробирок, поэтому запрещается маркировать крышки пробирок.

2. Внести в необходимое количество лунок стрипов по **12 мкл** подготовленной **реакционной смеси**. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

3. Используя наконечники с фильтром, внести по **12 мкл образцов анализируемой ДНК** в лунки стрипов, предназначенные для клинических образцов. Осторожно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

4. Используя наконечник с фильтром, внести **12 мкл** отрицательного контроля **К-** в лунку стрипа, предназначенную для К-. Осторожно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

5. Используя наконечник с фильтром, внести **12 мкл** положительного контроля **К+** в лунку стрипа, предназначенную для К+. Осторожно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

6. Закрыть стрипованные пробирки стрипованными крышками.

Внимание! Недопустимо образование в пробирках пузырьков воздуха и капель на стенках; при необходимости сбросить капли, открутив пробирки на вортексе.

Внимание! Пробы амплифицировать сразу после добавления исследуемых проб и контролей в реакционные смеси.

7.2.3. Проведение ПЦР-РВ.

1. Разместить стрипованные пробирки в анализатор. Запустить программу амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала в соответствии с инструкцией к анализатору:

Приборы планшетного типа				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресценции	Кол-во повторов цикла
1	95	10 мин	–	
2	95	15 с	–	45
	64	40 с	FAM, HEX,	

2. По окончании программы приступить к интерпретации результатов.

7.3. Учет и интерпретация результатов.

7.3.1. Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР-РВ. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов

Перед началом учета результатов убедиться, что базовая линия (величина Threshold) установлена правильно по каждому каналу детекции в отдельности (порог составляет 10% от амплитуды сигнала).

7.3.2. Проанализировать кривых накопления флуоресценции в лунках, соответствующих положительному K^+ и отрицательному K^- контролям.

Результаты анализа исследуемых образцов считаются достоверными только при

получении правильных результатов для контролей в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Результаты для контролей.

Контроль	Контролируемый этап исследования	сигнал флуоресценции по каналу	
		FAM	HEX
К-	ПЦР-PB	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР-PB	присутствует (<38)	отсутствует
Внутренний контроль	Выделение ДНК	не учитывается	присутствует (<30)

7.3.3. Принцип интерпретации результатов.

Результат анализа на обнаружение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса считается:

1. **Положительным**, если для данной пробы реакция на IS6110/*regX3* оценена как положительная, т.е. по каналу FAM определено значение порогового цикла C_t менее граничного.

2. **Отрицательным**, если для данной пробы реакция на IS6110/*regX3* оценена как отрицательная, т.е. по каналу FAM не определено значение порогового цикла C_t или оно более граничного, а реакция на внутренний контроль оценена как положительная, т.е. по каналу HEX определено значение порогового цикла C_t менее граничного.

3. **Недостоверным**, если для данной пробы реакция на IS6110/*regX3* оценена как отрицательная, т.е. по каналу FAM не определено значение порогового цикла C_t или оно более граничного, и реакция на внутренний контроль оценена как отрицательная, т.е. по каналу HEX не определено значение порогового цикла C_t или оно более граничного. В этом случае необходимо повторное проведение анализа с момента пробоподготовки.

7.3.4. Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Таблица 4. Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов.

Значение порогового цикла C_t по каналу		Интерпретация результата
FAM (IS6110 / <i>regX3</i>)	HEX (внутренний контроль)	

<38	<30	ДНК микобактерий туберкулезного комплекса обнаружена
<32	не учитывается	ДНК микобактерий туберкулезного комплекса обнаружена
>38	<30	ДНК микобактерий туберкулезного комплекса НЕ обнаружена
>38	>30	результат недостоверный

Внимание! Если для отрицательного контроля К- получен положительный результат по каналу FAM, то результаты определения всех положительных образцов считаются недействительными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации (реагенты и зона выделения ДНК, реагенты для ПЦР и зона для подготовки к проведению реакции) и провести повторное исследование всех положительных проб, начиная с этапа пробоподготовки.

8. НАСТРОЙКИ ПРИБОРОВ.

8.1. Настройки прибора для амплификатора CFX96 (BioRad).

Режим определения Ct – Единый пороговый уровень

Режим анализа – С вычетом базовой линии

8.2. Настройки прибора для амплификатора «ДТ-96» («ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия).

Тип анализа – Качественный

Метод – Геометрический (Cp)

Критерий положительного результата ПЦР – 90%

Величина Threshold – 10%

9. КОНТАМИНАЦИЯ.

ДНК микобактерий туберкулезного комплекса не должна выявляться в отрицательном контроле. Присутствие ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими

образцами или ранее амплифицированными продуктами, произошедшую во время приготовления образцов или во время подготовки к проведению исследования.

Для того чтобы избежать контаминации, необходимо произвести полную обработку лаборатории в соответствии с МУ-1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»; затем повторно провести анализ.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.

Контроль качества Набора реагентов при изготовлении осуществляется ОБТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 9398-001-26124018-2015.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.

11.1. Условия хранения.

Набор реагентов хранить в упаковке производителя до истечения срока годности.

- Реагент «СтопАктив МТБ-реагент» и комплект реагентов «Полипроб ДНК Преп», кроме Компонента Т, хранить при температуре от 18 до 25 °С.
- Комплект реагентов «Скрин ТБ ПЦР» и Компонент Т из комплекта реагентов «Полипроб ДНК Преп» хранить при температуре не выше минус 20 °С. Во избежание возможной кросс-контаминации Реагенты для амплификации и Контроли, входящие в состав комплекта реагентов «Скрин ТБ ПЦР», хранить отдельно.

11.2. Условия транспортировки.

Транспортирование Набора реагентов производится всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при соблюдении температурного режима.

- Реагент «СтопАктив МТБ-реагент» и комплект реагентов «Полипроб ДНК Преп», кроме Компонента Т, транспортировать при температуре от 18 до 25 °С.

- Комплект реагентов «Скрин ТБ ПЦР» и Компонент Т из комплекта реагентов «Полипроб ДНК Преп» транспортировать при температуре не выше минус 20 °С.

11.3. Срок годности Набора реагентов составляет 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

11.4. Срок годности вскрытых компонентов комплекта реагентов «Полипроб ДНК Преп» и реагента «СтопАктив МТБ-реагент» равен сроку годности невскрытых компонентов. Срок годности вскрытых компонентов комплекта реагентов «Скрин ТБ ПЦР» составляет 3 суток при температуре хранения от 2 до 8 °С. Вскрытые реагенты комплекта «Скрин ТБ ПЦР» повторному замораживанию не подлежат.

11.5. Готовая к работе реакционная смесь хранению не подлежит, ее остатки должны быть утилизированы.

11.6. Условия отпуска.

Для лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемических учреждений.

11.7. Ограничения метода.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.

Результаты анализа с использованием Набора реагентов должны интерпретироваться в сочетании с другими клинико-диагностическими и анамнестическими данными и только в составе комплексной диагностики туберкулеза.

11.8. Рекламации на качество Набора реагентов направлять в адрес предприятия-изготовителя: ООО «ЭнДжентикс» Россия, 125252, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д.12, ком. 1, тел./факс: +7 (495) 741-49-89.

Символы, используемые на упаковке изделия

	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Дата изготовления
	Ограничение температуры		Производитель
	Ограничение температуры		Верх
	Хрупкое. Осторожно		

Прошито и пронумеровано 25
(двадцать пять) лист

Генеральный директор ООО
«Энджентикс»
Е.А. Новоселова
Опись

