

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «ЭнДжентикс»



Петкова М.А.

ноября 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для дифференциального выявления ДНК
микобактерий туберкулезного комплекса, лекарственно
устойчивых/чувствительных к фторхинолонам, амикацину/канамицину,
каприомицину методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени
«Полипроб ЛУ ТБ-2»
по ТУ 9398-003-26124018-2015.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК), лекарственно устойчивых/чувствительных к фторхинолонам, амикацину/канамицину, каприомицину методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Полипроб ЛУ ТБ-2» по ТУ 9398-003-26124018-2015 (далее по тексту – Набор реагентов или Набор), предназначен для определения мутаций устойчивости (или их отсутствия) в ДНК МБТК к противотуберкулезным препаратам фторхинолонам, амикацину/канамицину, каприомицину в клиническом материале (мокроте) и бактериальных культурах, содержащих ДНК МБТК, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием гибридизационных зондов.

Устойчивость МБТК к инъекционным препаратам (канамицину, амикацину и капреомицину) определяется мутациями в позиции 1401 гена *rrs*.

Устойчивость МБТК к канамицину и амикацину определяется мутациями в позициях 514, 517 гена *rrs*, а также мутациями в позициях -10, -12 и -37 в промоторной области гена *eis*.

Устойчивость МБТК к фторхинолонам определяется мутациями в кодонах 89–94 гена *gyrA* и 538–540 гена *gyrB*.

Набор реагентов позволяет проводить быструю дифференциацию групп. Простой и удобный принцип дифференциации фенотипически устойчивых (R) и фенотипически чувствительных (S) форм микобактерий туберкулезного комплекса к фторхинолонам, амикацину/канамицину, каприомицину обеспечивает возможность быстрой диагностики широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) туберкулеза и своевременного назначения адекватной антибиотикотерапии.

Внимание!

Набор реагентов не предназначен для скрининга образцов на присутствие микобактерий туберкулезного комплекса.

Материалом для проведения анализа служат пробы ДНК, положительные на наличие ДНК микобактерий туберкулезного комплекса.

Область применения Набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика.

Набор реагентов используется в комплексной диагностике ШЛУ туберкулеза всех групп населения.

Потенциальный потребитель – профессиональная квалификационная группа «Средний медицинский и фармацевтический персонал не ниже 2 квалификационного уровня и профессиональная квалификационная группа «Врачи и провизоры» всех уровней (Приказ №526 от 06.08.2007 г. «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»).

1.2. Показания.

Необходимость определения мутаций устойчивости (или их отсутствия) ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) в пробах ДНК МБТК, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

1.3. Противопоказания.

Противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. 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.

Состав	Объем	Количество	Описание
Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, лекарственно устойчивых/чувствительных к фторхинолонам, амикацину/канамицину, каприомицину методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Полипроб ЛУ ТБ-2»			
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
Реагенты для амплификации:			
Тaq-полимераза	0,02 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
2х смесь ЛУ-SL	0,2 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
2х смесь ЛУ-FQ	0,2 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
Вода	1,0 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
Контроли:			
К-	0,06 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
K1+ТБ-2	0,06 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
K2+ТБ-2	0,06 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
K3+ТБ-2	0,06 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.
Kwt+ТБ-2	0,06 мл	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость.

2.2. Число анализируемых проб клинического материала.

Набор реагентов рассчитан на проведение 48 реакций амплификации, включая контрольные, и позволяет осуществить одновременный анализ от 1 до 43 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-, K1+ТБ-2, K2+ТБ-2, K3+ТБ-2, Kwt+ТБ-2), набор реагентов позволяет осуществить от одной постановки (43 клинических образца одновременно) до 8 постановок (по 1 клиническому образцу в каждой, всего 8 клинических образцов). Таким образом, с использованием реагента из каждой пробирки можно провести не более 2 постановок в течение 3 суток.

2.3. Принцип метода.

Принцип метода основан на повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей элонгации полинуклеотидных цепей с этих праймеров высокоспецифичным термостабильным ферментом Таq-полимеразой.

Амплификация проводится на анализаторе для проведения ПЦР с регистрацией результатов в режиме реального времени. Комплект Реагентов для амплификации содержит две

реакционные смеси **ЛЮ-SL** и **ЛЮ-FQ**, позволяющие выявлять формы МБТК, устойчивые к фторхинолонам, амикацину/канамицину, каприомицину.

На этапе амплификации в одной пробирке с каждой из реакционных смесей **ЛЮ-SL** и **ЛЮ-FQ** проводятся одновременно 4 реакции. Результаты амплификации регистрируются по 4 различным каналам флуоресцентной детекции.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды (зонды), содержащие флуоресцентные метки FAM, HEX, ROX, Cy5, 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 и детектировать генетические варианты дикого типа (wt).

Об отсутствии генетической мутации (*вариант дикого типа, wt*) судят по **наличию** кривой накопления флуоресценции с высокой эффективностью прироста флуоресценции (кривая флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы). Генетический вариант дикого типа определяет фенотипическую чувствительность к указанным антибиотикам (S).

Отсутствие кривой накопления флуоресценции, либо низкая эффективность прироста флуоресценции (отсутствует участок характерного экспоненциального подъема, график представляет собой приблизительно прямую линию) в пробе свидетельствуют о наличии *мутации* (mut), определяющей фенотипическую устойчивость к соответствующим антибиотикам (R).

В реакционную смесь **ЛЮ-FQ** включены праймеры и зонд, позволяющие выявлять **эндогенный Внутренний контроль (IC)** – видоспецифичный участок ДНК МБТК, детектируемый по каналу Cy5. Эндогенный внутренний контроль служит контролем проведения ПЦР и позволяет оценить качество взятия и хранения исследуемого биологического материала. Наличие сигнала флуоресценции со значением Ct(Cp) в пределах диапазона от 12 до 29 свидетельствует о содержании в образце ДНК МБТК, достаточном для получения достоверных результатов.

Образцы, не содержащие, а также имеющие низкое содержание ДНК МБТК (значение Ct(Cp) IC больше граничного), рассматриваются как невалидные.

Образцы, для которых установлено значение Ct(Cp) IC ниже указанного диапазона, характеризуются избыточным содержанием ДНК МБТК. В этом случае рекомендуется повторить исследование, используя в качестве матрицы 100-кратное разведение образца.

В исследуемой группе **ЛЮ-SL** контролем прохождения ПЦР служит одна или несколько кривых накопления, соответствующих детекции мишени дикого типа. В случае одновременного отсутствия кривых накопления по всем мишеням в группе **ЛЮ-SL** результаты исследования считаются невалидными.

Характеристика молекулярных мишеней.

Реакционная смесь ЛЮ-SL

Олигонуклеотидный зонд, детектирующий кодон **a1401** гена *rrs*, содержит флуоресцентную метку FAM и позволяет дифференцировать генетические варианты дикого типа от вариантов, несущих мутации в указанном кодоне.

Олигонуклеотидный зонд, детектирующий позиции **-10/-12** промоторной области гена *eis*, содержит флуоресцентную метку HEX и позволяет дифференцировать генетические варианты дикого типа от вариантов, несущих мутации в указанных позициях гена *eis*.

Олигонуклеотидный зонд, детектирующий мишени **514 и 517** гена *rrs*, содержит флуоресцентную метку ROX и позволяет дифференцировать генетические варианты дикого типа от вариантов, несущих мутации в указанных мишенях.

Олигонуклеотидный зонд, детектирующий позицию **-37** промоторной области гена *eis*, содержит флуоресцентную метку Cy5 и позволяет дифференцировать генетические варианты дикого типа от вариантов, несущих мутацию в указанной позиции.

Реакционная смесь ЛУ-FQ

Олигонуклеотидные зонды, детектирующие мишени **gyrA94** и **gyrA90**, содержат флуоресцентные метки FAM и ROX соответственно и позволяют дифференцировать генетические варианты дикого типа от вариантов, несущих мутации в кодонах **89, 90, 91 и 94** гена *gyrA*. Дифференциация осуществляется благодаря закономерной кинетике кривых накопления, в зависимости от мутантного кодона.

Олигонуклеотидный зонд, детектирующий кодоны **539, 540** гена *gyrB* содержит флуоресцентную метку HEX и позволяет дифференцировать генетические варианты дикого типа от вариантов, несущих мутацию в указанном кодоне.

Олигонуклеотидный зонд, детектирующий эндогенный Внутренний контроль **IC**, содержит флуоресцентную метку Cy5 и служит для детекции видоспецифичного участка МБТК. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, должна всегда присутствовать в образце в достаточном количестве. Результат исследования считается достоверным только в том случае, если значение Ct(Cp) по каналу Cy5 для данной мишени определено в пределах рекомендованного диапазона. Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа, но и оценивать адекватность биологического материала. В случаях, если биологический материал содержит недостаточное количество ДНК МБТК, кривая накопления по каналу Cy5 будет иметь Ct(Cp) выше граничного значения. В случае содержания в реакционной смеси ингибиторов ПЦР сигнал амплификации **IC** будет низким.

В таблицах 2 и 3 приведены характеристики входящих в Набор реагентов олигонуклеотидных зондов и контролей.

Таблица 2. Характеристика олигонуклеотидных зондов.

Мишень	Флуоресцентная метка	Характеристика	Кинетика кривых накопления	Диагностическая специфичность (выявляемая мутация)
Реакционная смесь ЛУ-SL				
a1401 rrs	FAM	Наличие сигнала с высокой эффективностью прироста флуоресценции указывает на генетический вариант дикого типа, определяющий фенотипическую чувствительность (S). Отсутствие кривой накопления либо низкая эффективность прироста флуоресценции указывает на генетическую мутацию, ассоциированную с ЛУ (R).	Прирост флуоресценции относительно положительного контроля <10%	a1401g
-10, -12 eis	HEX	Наличие сигнала с высокой эффективностью прироста флуоресценции указывает на генетический вариант дикого типа, определяющий фенотипическую чувствительность (S). Отсутствие кривой накопления либо низкая эффективность прироста флуоресценции указывает на генетическую мутацию, ассоциированную с ЛУ (R).	Прирост флуоресценции относительно положительного контроля <10%	g-12a
			Прирост флуоресценции относительно положительного контроля не более 30%	c-10t

Мишень	Флуоресцентная метка	Характеристика	Кинетика кривых накопления	Диагностическая специфичность (выявляемая мутация)
514, 517 rrs	ROX	Наличие сигнала с высокой эффективностью прироста флуоресценции указывает на генетический вариант дикого типа, определяющий фенотипическую чувствительность (S). Отсутствие кривой накопления, либо низкая эффективность прироста флуоресценции указывает на генетическую мутацию, ассоциированную с ЛУ (R).	Прирост флуоресценции относительно положительного контроля < 10%	c517t
			Прирост флуоресценции относительно положительного контроля не более 20%	a514c
37 eis	Cy5	Наличие сигнала с высокой эффективностью прироста флуоресценции указывает на генетический вариант дикого типа, определяющий фенотипическую чувствительность (S). Отсутствие кривой накопления, либо низкая эффективность прироста флуоресценции указывает на генетическую мутацию, ассоциированную с ЛУ (R).	Прирост флуоресценции относительно положительного контроля < 10%	c37a
Реакционная смесь ЛУ-FQ				
D94 gyrA	FAM, ROX	Наличие сигнала с высокой эффективностью прироста флуоресценции указывает на генетический вариант дикого типа, определяющий фенотипическую чувствительность (S). Отсутствие кривой накопления, либо низкая эффективность прироста флуоресценции указывает на генетическую мутацию, ассоциированную с ЛУ (R).	Прирост флуоресценции по каналу FAM относительно положительного контроля <20% и одновременное присутствие кривой накопления по каналу ROX с эффективностью прироста флуоресценции близкой к 100%. -	D94G D94N D94A D94Y D94H
			Кривая накопления по каналу FAM с эффективностью прироста флуоресценции близкой к 100% и одновременное отсутствие кривой накопления по каналу ROX	D89G
			Прирост флуоресценции по каналу FAM относительно положительного контроля <35% и одновременное отсутствие кривой накопления по каналу ROX	A90V
			Одновременное отсутствие кривых накопления по каналам	S91P

Мишень	Флуоресцентная метка	Характеристика	Кинетика кривых накопления	Диагностическая специфичность (выявляемая мутация)
			FAM и ROX	
gyrB	HEX	Наличие сигнала с высокой эффективностью прироста флуоресценции указывает на генетический вариант дикого типа, определяющий фенотипическую чувствительность (S). Отсутствие кривой накопления, либо низкая эффективность прироста флуоресценции указывает на генетическую мутацию, ассоциированную с ЛУ (R).	Прирост флуоресценции относительно положительного контроля <10%	T539N
			Прирост флуоресценции относительно положительного контроля не более 30%	E540D
IC	Cy5	Наличие сигнала флуоресценции со значением Ct(Cp) в пределах указанного диапазона указывает на достаточное содержание в исследуемом образце ДНК МБТК. Отсутствие сигнала, либо низкая эффективность прироста флуоресценции указывают на отсутствие в образце ДНК МБТК либо ингибирование ПЦР.	Кинетика кривых с высокой эффективностью прироста флуоресценции. Результаты по Внутреннему контролю IC валидны при значениях Ct(Cp) в диапазоне от 12 до 29	ДНК МБТК

Таблица 3. Характеристика контролей.

Контроль	Диагностическая специфичность (выявляемая мутация)							ДНК МБТК (IC)	Характеристика
	a1401g rrs	-10/-12 eis	a514c, c517t rrs	37 els	94gyr A	gyrB	90gyr A		
К-	Не содержит специфических мишеней								Предназначен для контроля кросс-контаминации и отсутствия ложноположительных результатов
К1+ТБ-2	mut	mut	wt	wt	mut	mut	wt	+	Комплексный контроль предназначен для контроля детекции мутаций в позициях 1401 rrs, -10 eis, 94gyrA, 539gyrB. Содержит мишень эндогенного Внутреннего контроля IC
К2+ТБ-2	wt	wt	mut	mut	mut (35%)	wt	mut	+	Предназначен для контроля детекции мутации в позициях 514 rrs, 37 eis, 90gyrA. Содержат мишень эндогенного Внутреннего контроля IC
К3+ТБ-2	wt	mut	mut	wt	wt	mut	mut	+	Предназначен для контроля детекции мутации в позициях -12 eis, 517 rrs, 539gyrB, 89gyrA. Содержат мишень эндогенного Внутреннего контроля IC
Кwt+ТБ-2	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	Предназначен для контроля выявления генетических форм ди-

										кого типа, определяющих фенотипическую чувствительность (S). Содержат мишень эндогенного Внутреннего контроля IC
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

Контрольные образцы K1, K2, K3, **Kwt** помимо целевых мишеней содержат эндогенный Внутренний контроль IC.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики.

3.1.1. 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, – 200 КОЕ на 1 мл образца.

3.1.2. Аналитическая специфичность.

Аналитическая специфичность подтверждена отсутствием ложноположительных результатов в образцах, не содержащих микроорганизмы рода *Mycobacterium*. Аналитическая специфичность исследована при постановке отрицательного контроля К-.

Возможно наличие слабых сигналов флуоресценции в образцах, содержащих микобактерии нетуберкулезного комплекса (МАС) ввиду высокой степени гомологии генов у видов рода *Mycobacterium*. В этом случае система автоматически определяет образец как сомнительный, так как алгоритм трансляции результатов предполагает правильную оценку по целому ряду контрольных точек в отношении всех анализируемых мишеней.

3.2. Диагностические характеристики.

Для определения диагностических характеристик Набора реагентов «Полипроб ЛУ ТБ-2» были использованы образцы нативной мокроты и клинических изолятов МБТК, полученные из образцов мокроты от больных с верифицированным диагнозом «Туберкулез легких», «ЦЛЛУ туберкулез легких» и «Мультирезистентный туберкулез легких».

В исследование было включено 224 образца от 112 пациентов (50 образцов мокроты от пациентов с диагнозом ШЛУ туберкулез, 12 образцов мокроты от пациентов с диагнозом мультирезистентный туберкулез, 50 образцов мокроты от пациентов с диагнозом чувствительный туберкулез, 50 образцов клинических изолятов (бактериальных культур) - диагноз ШЛУ туберкулез, 12 образцов клинических изолятов (бактериальных культур) - диагноз мультирезистентный туберкулез, 50 образцов клинических изолятов (бактериальных культур) - диагноз чувствительный туберкулез).

3.2.1. Диагностическая чувствительность.

Диагностическая чувствительность Набора реагентов составила:

- для фторхинолонов при 55 положительных результатах составила 94,7% - 100% с доверительной вероятностью 95%.
- для амикацина/канамицина при 49 положительных результатах составила 94,1% - 100% с доверительной вероятностью 95%.
- для каприомицина при 43 положительных результатах составила 93,3% - 100% с доверительной вероятностью 95%.

3.2.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность Набора реагентов составила:

- для фторхинолонов при 57 положительных результатах составила 94,9% - 100% с доверительной вероятностью 95%.

- для амикацина/канамицина при 63 положительных результатах составила 95,4% - 100% с доверительной вероятностью 95%.

- для каприомицина при 69 положительных результатах составила 95,8% - 100% с доверительной вероятностью 95%.

3.3. Воспроизводимость.

Результаты дифференциального выявления множественно лекарственно устойчивых / чувствительных форм с использованием Набора реагентов демонстрируют высокую воспроизводимость между постановками в пределах аналитической чувствительности метода коэффициент вариации CV не более 10%.

Амплификация была проведена на термоциклерах CFX96 (BioRad, США) и «ДТ-96» (НПО «ДНК-Технология», Россия). Интерпретация результатов проводилась согласно инструкции изготовителя Набора реагентов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

4.1. Использовать только для диагностики *in vitro*.

4.2. Потенциальный риск применения Набора реагентов – класс 2б.

4.3. Работу с использованием Набора реагентов осуществлять согласно правилам МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV группы патогенности», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

4.4. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологические отходы следует утилизировать в соответствии со схемой, принятой в организации, в соответствии с 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.

- Применять Набор реагентов строго по назначению, согласно данной инструкции.

- Допускать к работе с Набором реагентов только специально обученный персонал.

- Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.

- 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.

- 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

1. 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.
2. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) II класса защиты.
3. Вортекс.
4. Холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С.
5. Морозильная камера, поддерживающая температуру не выше минус 20 °С.
6. Автоматические или электронные дозаторы переменного.
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема.
8. Штативы для наконечников.
8. Емкость для сброса наконечников.
10. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки типа Эппендорф объемом 0,5 или 1,5 мл.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

- 6.1. Материалом для проведения анализа служат пробы ДНК, положительные на наличие ДНК микобактерий туберкулезного комплекса.
- 6.2. Ограничения по использованию анализируемого материала.

Образцы с высоким содержанием ДНК МБТК (выделенные из культур) рекомендуется предварительно развести 100-кратно. Для приготовления разведений необходимо использовать компонент «Вода», входящий в состав Реагентов для амплификации Набора реагентов «Полипроб ЛУ ТБ-2».

- 6.4. Условия хранения анализируемых образцов.

Образцы ДНК можно хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение 6 месяцев. При необходимости более длительного хранения – не выше минус 80°С в течение 3 лет.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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.

Перед проведением анализа на лекарственную устойчивость/чувствительность с помощью Набора реагентов «Полипроб ЛУ ТБ-2» необходимо выделить ДНК МБТК из клинического образца (части образца), бактериальной культуры и провести анализ на обнаружение ДНК МБТК.

Выделение ДНК МБТК из клинического образца (части образца), бактериальной культуры и проведение анализа на обнаружение ДНК МБТК может осуществляться Набором реагентов для обнаружения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Полипроб скрин ТБ» (ООО «ЭнДжентикс», Россия) №РЗН 2017/6266 от 20.09.2017 г. или любым другим из зарегистрированных на территории

Российской Федерации наборов, предназначенных для выделения и обнаружения ДНК МБТК из клинического материала и культуры МБТК, согласно инструкции к наборам.

Материалом для проведения анализа с помощью Набора реагентов «Полипроб ЛУ ТБ-2» служат пробы ДНК, положительные на наличие ДНК микобактерий туберкулезного комплекса.

Анализ с помощью Набора реагентов «Полипроб ЛУ ТБ-2» состоит из следующих этапов:

- приготовление реакционных смесей;
- подготовка к проведению ПЦР-РВ;
- проведение ПЦР-РВ;
- учет результатов анализа.

7.1. Приготовление реакционных смесей.

Внимание! Для каждого клинического образца исследование включает анализ с использованием двух реакционных смесей ЛУ-SL и ЛУ-FQ, каждая из которых служит для выявления мутаций устойчивости к соответствующему антибиотику.

Схема анализа клинических образцов:

2х смесь	Схема анализа
ЛУ- SL	Клинические образцы (N)
	К-
	K1+ТБ-2
	K2+ТБ-2
	K3+ТБ-2
	Kwt+ТБ-2
ЛУ- FQ	Клинические образцы (N)
	К-
	K1+ТБ-2
	K2+ТБ-2
	K3+ТБ-2
	Kwt+ТБ-2

1. Определить по схеме приготовления реакционных смесей (таблица 4) количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию амплификации требуется **13 мкл 2х смеси** и **0,7 мкл Таq-полимеразы**. Смесь готовить на общее число исследуемых образцов и контролей (пять контролей: К-, K1+ТБ-2, K2+ТБ-2, K3+ТБ-2, Kwt+ТБ-2) плюс запас на одну реакцию.

Внимание! Необходимо приготовить две реакционные смеси – первую с использованием **2х смеси ЛУ-SL**, и вторую с использованием **2х смеси ЛУ-FQ**.

Таблица 4. Схема приготовления реакционных смесей.

Количество исследуемых клинических образцов	Количество исследуемых в ПЦР-РВ образцов ¹ для каждой из 2х смесей	Количество реакций амплификации ² для каждой из 2х смесей	2х смесь, мкл	Таq-полимераза, мкл	Требуемое для исследования количество лунок стрипованных пробирок ³
1	6	7	91	4,9	12
7	12	13	169	9,1	24

¹ количество исследуемых клинических образцов + контроли К-, K1+ТБ-1, K2+ТБ-1, Kwt+ТБ-1
² количество исследуемых образцов + контроли К-, K1+ТБ-1, K2+ТБ-1, Kwt+ТБ-1+ запас на одну реакцию. В случае исследования одновременно 44 клинических образцов, рекомендуется готовить реакционную смесь с запасом на две реакции
³ Для проведения исследования с двумя реакционными смесями (2х смесь ЛУ-R и 2х смесь ЛУ-Н)

2. Разморозить при комнатной температуре (от 18 до 25⁰С) Реагенты для амплификации (**2х смесь ЛУ-SL и 2х смесь ЛУ-FQ, Воду** (Воду использовать только при необходимости разведения образцов с высоким содержанием ДНК МБТК)), и Контроли (**К-, K1+тб-2, K2+тб-2, K3+тб-2, Kwt+тб-2**). 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.

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 отдельных одноразовых пробирках типа Эппендорф две реакционные смеси – ЛУ-SL и ЛУ-FQ, используя рассчитанное количество 2х смесей и Таq-полимеразы. Аккуратно перемешать на вортексе полученные реакционные смеси и осадить капли с крышек кратким центрифугированием на вортексе

Внимание! После внесения термостабильного фермента Таq-полимеразы готовые реакционные смеси не подлежат хранению, после использования остатки реакционных смесей должны быть утилизированы.

7.2. 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** ЛУ-SL в лунки, предназначенные для ЛУ-SL. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

3. Внести в необходимое количество лунок стрипов по **12 мкл** подготовленной **реакционной смеси** ЛУ-FQ в лунки, предназначенные для ЛУ-FQ. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

4. Используя наконечники с фильтром, внести по **12 мкл образцов анализируемой ДНК** в лунки стрипов с каждой реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

5. Используя наконечники с фильтром, внести по **12 мкл К-** в лунки стрипов с каждой реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

6. Используя наконечники с фильтром, внести по **12 мкл** каждого из положительных контролей (**K1+тб-2, K2+тб-2, K2+тб-2, Kwt+тб-2**) в лунки стрипов с каждой реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

7. Закрыть стрипованные пробирки стрипованными крышками.

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

7.3 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 (за исключением приборов фирмы «ДНК-Технология»)					Приборы фирмы «ДНК-Технология»				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресценции	Кол-во повторов цикла	Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресценции	Кол-во повторов цикла
1	95	10 мин	–		1	95	10 мин	–	
2	95	15 с	–	9	2	95	15 с	–	9
	62	20 с	–			62	20 с	–	
	72	15 с	–			72	25 с	–	
3	95	15 с	–	40	3	95	15 с	–	40
	66	40 с	FAM, HEX, ROX, Cy5			66	45 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	

2. По окончании программы приступить к интерпретации результатов.

8. ПОРЯДОК ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР-РВ. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 4 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 (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов.

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

8.2. Проанализировать характер кривых накопления флуоресценции в лунках, соответствующих положительным контролям K1+тб-2, K2+тб-2, K3+тб-2, Kwt+тб-2 и отрицательному контролю K-. В лунках, соответствующих K-, прирост флуоресценции должен быть низким или отсутствовать (значение Ct(Cp) более 29).

Внимание! Результаты анализа исследуемых образцов считаются достоверными только при получении правильных результатов для контролей в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Результаты для контролей.

Кон-троль	ЛУ-SL				ЛУ-FQ			
	FAM	HEX	ROX	Cy5	FAM	HEX	ROX	Cy5
K-	Ct(Cp) более 29	Ct(Cp) более 29	Ct(Cp) более 29	Ct(Cp) более 29	Ct(Cp) более 29	Ct(Cp) более 29	Ct(Cp) более 29	Ct(Cp) более 29
K1+тб-2	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Ct(Cp) от 12 до 29
K2+тб-2	Кривая накопления с высокой эффектив-	Кривая накопления с высокой эффектив-	Прирост флуоресценции низкий	Прирост флуоресценции низкий	Прирост флуоресценции низкий	Кривая накопления с высокой эффектив-	Прирост флуоресценции низкий	Ct(Cp) от 12 до 29

	ностью прироста флуоресценции	ностью прироста флуоресценции	или отсутствует	или отсутствует	или отсутствует	ностью прироста флуоресценции	или отсутствует	
K3+тб-2	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	St(Cp) от 12 до 29
Kwt+тб-2	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	St(Cp) от 12 до 29

8.3. Оценить исследуемые образцы в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6. Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов.

Исследуемый образец	Положительный контроль дикого типа (Kwt)	Положительный контроль мутации (K1, K2, K3)	Отрицательный контроль	Внутренний контроль (IC)	Интерпретация	Дальнейший порядок работы
Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции, St (Cp) менее 29	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Кривая накопления отсутствует	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции, St (Cp) в диапазоне от 12 до 29	Дикий тип (wt)	Необходимо оценить результаты по всем мишеням
Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Кривая накопления отсутствует	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции, St (Cp) в диапазоне от 12 до 29	Мутация (mut)	Необходимо оценить результаты по всем мишеням
Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции, St(Cp) менее 29	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления с высокой эффективностью прироста флуоресценции	Кривая накопления отсутствует	Не учитывается	Невалидный результат (ложноотрицательный)	Требуется повторная постановка с целью получения валидного результата
Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Кривая накопления отсутствует	Не учитывается	Невалидный результат (ложноположительный)	Ошибка в постановке теста, требуется повторная постановка с целью получения валидного результата

Отсутствие кривых накопления одновременно по всем мишеням, либо Ct(Cp) более 29	Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Невалидный результат	1.Содержание ДНК в образце ниже аналитической чувствительности метода 2. Ошибка в постановке теста, необходимо повторить исследование данного образца
Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Кривая накопления с Ct (Cp) менее 29	Не учитывается	Невалидный результат	1. Кросс контаминация. Необходимо провести анализ заново 2. Необходимо уточнить схему постановки образцов, возможно, образцы и контроли перепутаны
Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Отсутствие кривых накопления либо Ct (Cp) более 29	Невалидный результат	Содержание ДНК в образце ниже аналитической чувствительности метода
Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Ct(Cp) менее 12	Избыток ДНК в анализируемой пробе	Повторить исследование, используя 100-кратное разведение образца ДНК
Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Прирост флуоресценции низкий или отсутствует	Невалидный результат	1. В образце присутствуют ингибиторы ПЦР 2. Ошибка в постановке теста, необходимо повторить исследование данного образца

9. НАСТРОЙКИ ПРИБОРОВ

9.1. Настройки прибора для амплификатора CFX96 (BioRad, США).

1. Настройки прибора.

Режим определения Ct – Единый пороговый уровень/Регрессия.

Режим анализа – С вычетом базовой линии.

9.2. Настройки прибора для амплификатора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).

Анализатор «ДТ-96» (НПО «ДНК-Технология», Россия) осуществляет трансляцию результатов автоматически. По окончании амплификации программа формирует отчет, содержащий данные об образцах и результатах исследования по каждой мишени с указанием значения Cp.

В случае получения сомнительных результатов рекомендуем провести оценку результатов в режиме анализа «Мультиплекс» со следующими настройками прибора:

Настройки прибора:

Тип анализа – Мультиплекс

Метод – Геометрический (Cp)/Исходные данные

Критерий положительного результата ПЦР – 90%

Критерии достоверности результатов:

- нижняя граница 30%
- верхняя граница 30%

В соответствии с таблицей 6 оценить все исследуемые образцы с сомнительным результатом, выбирая последовательно метод – «Геометрический» и «Исходные данные».

10. 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.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества Набора при изготовлении осуществляет ОБТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 9398-003-26124018-2015.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Информация, об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) данного изделия.

12.1. Условия хранения.

Набор реагентов хранить при температуре не выше минус 20°C в упаковке производителя до истечения срока годности. Во избежание возможной кросс-контаминации Реагенты для амплификации хранить отдельно от Контролей.

Хранение изделий ниже минус 20°C должно осуществляться в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Хранение светочувствительных изделий должно осуществляться в темном месте.

12.2. Условия транспортировки

Набор реагентов транспортировать при температуре не выше минус 20 °C. Транспортирование Набора реагентов производится всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при соблюдении температурного режима.

Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения "Холодовой цепи", обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

12.3. Срок годности Набора реагентов составляет 12 месяцев с даты производства. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

12.4. Срок годности вскрытых компонентов изделия (реагентов) после размораживания составляет не более 3 суток при температуре хранения от 2 до 8 °C. Вскрытые реагенты повторному замораживанию не подлежат.

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

12.6. Условия отпуска.

Для лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемических учреждений.

12.7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА.

• **ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.**

- Набор реагентов не предназначен для скрининга образцов на присутствие микобактерий туберкулезного комплекса.

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

- Материалом для проведения анализа служат пробы ДНК, положительные на наличие ДНК микобактерий туберкулезного комплекса.

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

- Набор реагентов не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

12.8. Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

Специфические воздействия Набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для окружающей среды.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор реагентов безопасен, не является источником загрязнения окружающей среды. Материалы, из которых изготовлены Наборы, не обладают способностью образовывать токсичные соединения в воздушной среде и сточных водах в присутствии других веществ при температуре окружающей среды.

Потенциальная возможность возгорания или взрыва при использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности отсутствует.

12.9. Производитель ООО «ЭнДжентикс» гарантирует соответствие Наборов реагентов установленным требованиям стандартов и документации производителя при соблюдении условий транспортирования, хранения, эксплуатации, стабильность Наборов реагентов на протяжении всего срока годности.

12.10. 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 по каталогу		Содержимое достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изменения		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Верхняя граница температурного диапазона		Изготовитель

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
«ООО ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
«  » ноября 2018г.

02 НОЯ 2018



Варнавичус П.К.

и скреплено печатью

18 (восемнадцать) листов
цифрами прописью

Генеральный директор ООО «ЭнДжентикс»

Петкова М.А.

« 00 » ноября 2018 г.



ПРОШУ
В КОЛИЧЕСТВЕ 18 ЛИСТОВ

« 02 » ноября 2018 г.

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Ванавичус П.К.

