

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от 04.05.2012 № 2126-12/12

УТВЕРЖДАЮ  
Директор Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
В.И. Покровский  
2012 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза  
(*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом  
материале, культурах микроорганизмов и объектах  
окружающей среды методом полимеразной цепной реакции  
(ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией  
«АмплиСенс® МТС-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Центральный научно-исследовательский  
институт эпидемиологии»,  
Российская Федерация, 111123,  
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

### СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ                                                                                                  | 3  |
| НАЗНАЧЕНИЕ                                                                                                         | 3  |
| ПРИНЦИП МЕТОДА                                                                                                     | 3  |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ                                                                           | 4  |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ                                                                                       | 6  |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ                                                                                              | 8  |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ                                                                            | 9  |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА                                                        | 12 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК                                                                 | 14 |
| ФОРМАТ FEP                                                                                                         | 16 |
| СОСТАВ                                                                                                             | 16 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ                                                                                        | 18 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ                                                                             | 18 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ                                                                                            | 18 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации                                                                            | 20 |
| Б. Проведение амплификации                                                                                         | 20 |
| ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»                                                 | 20 |
| ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ                                                                                          | 21 |
| ФОРМАТ FRT                                                                                                         | 25 |
| СОСТАВ                                                                                                             | 25 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ                                                                                        | 27 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ                                                                             | 27 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»                                                   | 27 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации                                                                            | 27 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»                                                | 28 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ                                                                                 | 30 |
| СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ                                                                | 33 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» | 34 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»  | 36 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-С» | 38 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ                                                                         | 41 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

|                                          |                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| БАЛ                                      | - бронхо-альвеолярный лаваж                                                                                                                                                                   |
| ВКО                                      | - внутренний контрольный образец                                                                                                                                                              |
| ВКО STI-87                               | - внутренний контрольный образец STI (self-tested inclusion) длиной 87 нуклеотидов для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией                                                       |
| K-                                       | - отрицательный контроль ПЦР                                                                                                                                                                  |
| K+                                       | - положительный контроль ПЦР                                                                                                                                                                  |
| МБТ (MTC)                                | - микобактерии туберкулеза ( <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> )                                                                                                                      |
| М.т.                                     | - микробные тела                                                                                                                                                                              |
| ОКО                                      | - отрицательный контрольный образец                                                                                                                                                           |
| ОК                                       | - отрицательный контроль экстракции                                                                                                                                                           |
| ПВБ                                      | - промывные воды бронхов                                                                                                                                                                      |
| ПКО                                      | - положительный контрольный образец                                                                                                                                                           |
| ПЦР                                      | - полимеразная цепная реакция                                                                                                                                                                 |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FEP                                      | - флуоресцентная детекция по «конечной точке»                                                                                                                                                 |
| FRT                                      | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»                                                                                                                                        |
| PBS                                      | - фосфатно-солевой буфер                                                                                                                                                                      |
| UDG                                      | - фермент UDG – фермент урацил-ДНК-гликозилаза                                                                                                                                                |

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» предназначен для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), включающий в себя виды микобактерий разной степени вирулентности, вызывающих туберкулез у человека (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canettii*, *M.pinipedi*), в разных видах клинического материала, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией. **ВНИМАНИЕ!** Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания<sup>1</sup>.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Обнаружение ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) – методом

<sup>1</sup> В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 3 из 41

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: 1) экстракцию (выделение) тотальной ДНК из образцов клинического материала, парафиновых блоков, культур микроорганизмов или смывов с объектов окружающей среды, а также внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), внесенного в тестируемый образец в начале анализа; 2) одновременную амплификацию фрагмента ДНК МТС, т.е. микобактерий туберкулеза, и фрагмента ДНК ВКО; 3) гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (формат FRT), либо после ее завершения с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (формат FEP).

Гибридационно-флуоресцентная детекция специфической мишени проводится по каналу FAM/Green (или аналогичному, в зависимости от модели прибора), ВКО – по каналу JOE/Yellow/HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора).

«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT, входящие в состав данного набора реагентов, содержат фермент UDG для снижения риска контаминации продуктами амплификации в ПЦР-лабораториях.

С целью оптимизации протоколов исследования микобактерий туберкулеза возможно проведение единой процедуры экстракции ДНК для последующего обнаружения, количественного определения, дифференцирования до вида *M.tuberculosis complex* и определения резистентности к противотуберкулезным препаратам.

## ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

### Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 4 из 41

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

|     |                                  |  |                                                       |
|-----|----------------------------------|--|-------------------------------------------------------|
| REF | Номер в каталоге                 |  | Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации |
| LOT | Код партии                       |  | Максимальное число тестов                             |
| IVD | Изделие для in vitro диагностики |  | Использовать до                                       |
| VER | Дата изменения                   |  | Обратитесь к руководству по эксплуатации              |
|     | Ограничение температуры          |  | Не допускать попадания солнечного света               |
|     | Верхнее ограничение температуры  |  | Дата изготовления                                     |
|     | Производитель                    |  |                                                       |

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 41 из 41

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

9. Повторить процедуру отмывки раствором для отмывки 2, отобрать надосадочную жидкость полностью.
  10. Поместить пробирки в термостат при температуре 64 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
  11. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 64 °C на 5-8 мин, периодически (1 раз в мин) встряхивая на вортексе.
  12. Процентрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (проба ДНК). Образцы готовы к постановке ПЦР.
- Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °C и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °C.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 40 из 41

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплекта 1, 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК и амплификацию ДНК МТС с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплекта 4 предназначена для проведения амплификации ДНК МТС с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплекта 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплекта 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

### Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплекта 1, 2, 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК и амплификацию ДНК МТС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 5 из 41

Форма комплекта 4 предназначена для проведения амплификации ДНК МТС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплекта 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплекта 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

### АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### Аналитическая чувствительность

| Вид клинического материала                                                                     | Комплект для экстракции ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствительность, м.т./мл<br><i>M. tuberculosis</i> (штамм H37 Ra) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| PBS-буфер, мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж                                                  | «РИБО-преп»                 | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT    | 5x10 <sup>2</sup>                                                                |
| Моча                                                                                           |                             | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT    | 1x10 <sup>3</sup>                                                                |
| Смывы с объектов окружающей среды <sup>2</sup>                                                 |                             | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT    | 2,5x10 <sup>2</sup> копий/мл                                                     |
| PBS-буфер, мокрота                                                                             | «ДНК-сорб-В»                | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT    | 5x10 <sup>2</sup>                                                                |
| Бронхоальвеолярный лаваж, моча                                                                 |                             | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT    | 1x10 <sup>3</sup>                                                                |
| Смывы с объектов окружающей среды <sup>2</sup>                                                 |                             | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT    | 2,5x10 <sup>2</sup> копий/мл                                                     |
| 10% гомогенат разных видов тканей (легкие, лимфатические узлы, почки, печень, мозг, селезенка) | «ДНК-сорб-С»                | «ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT    | 1x10 <sup>3</sup>                                                                |

<sup>2</sup> Допускается проведение исследования без этапа экстракции ДНК при добавлении образца смывов с объектов окружающей среды непосредственно в реакционную смесь для проведения ПЦР-исследования.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 6 из 41

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- а) Подготовить полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
- б) В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОК, используя наконечники с фильтром.
- в) Перенести из ступки в пробирки 20 мкл гомогенизированного образца.
- г) Инкубировать образцы при температуре 65 °C в течение 1 ч, периодически встряхивая на вортексе (не менее 5 раз).
- д) Осадить нерастворенные частицы образцов центрифугированием при 12 тыс g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость в объеме 350 мкл очень аккуратно отобрать отдельными наконечниками с фильтром и перенести в новые пробирки объемом 1,5 мл.
5. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, оставить в штативе на 10-15 мин, перемешивая через каждые 2 мин.
6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс g в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
7. Добавить в образцы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс g на микроцентрифуге в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
8. Добавить в образцы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс g на микроцентрифуге. Отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 30 из 41

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-С»

## Порядок работы

1. Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести по 400 мкл буфера для лизирующего реагента, по 17 мкл лизирующего реагента и по 10 мкл ВКО STI-87 на каждую пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием.
3. При использовании центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» или гомогенизатора TissueLyser LT:
  - а) Подготовить полипропиленовые заворачивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл или свободностоящие объемом 2,0 мл, соответственно.
  - б) В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОК, используя наконечники с фильтром.
  - в) Внести в каждую из подготовленных пробирок с фрагментами ткани и шариками, а также в пробирку ОК, по 425 мкл смеси отдельными наконечниками с фильтром.
  - г) Поместить пробирки в ротор центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» и установить следующий режим:

| RPm  | Vortex | Cycle |
|------|--------|-------|
| 1000 | hard   | 140   |
| 0,01 | 20     | stop  |

или в ротор гомогенизатора и установить режим: частота 50 Гц, время 2 мин.

- д) Перенести пробирки в термостат и провести инкубирование образцов при температуре 65 °С в течение 10 мин.
4. При использовании фарфоровых ступок для гомогенизации образца ткани:

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG), Q, SC, D195).  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 38 из 41

## Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность оценивалась как при тестировании штаммов микобактерий входящих в группу *M.tuberculosis complex*, так и нетуберкулезных микобактерий, а также штаммов микроорганизмов, вызывающих заболевания сходных локализаций.

Для определения аналитической специфичности на штаммах различных микроорганизмов (в концентрации не менее, чем  $5 \times 10^8$  м.т./мл), тестировали 67 контрольных штаммов или клинических изолятов. Из них 16 входили в состав группы *M.tuberculosis complex*, 23 являлись нетуберкулезными микобактериями, 28 принадлежали к другим родам и семействам. Специфичность набора реагентов оценивалась по отсутствию положительного результата амплификации ДНК бактерий, не принадлежащих к *M.tuberculosis complex*, а также по наличию положительного результата у бактерий, входящих в состав этой группы.

## Перечень референтных штаммов и клинических изолятов:

- Микобактерии, принадлежащие к группе *Mycobacterium tuberculosis complex*: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis BCG* и др.
- 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.terrae* и др.
- Бактерии, принадлежащие к другим родам и семействам: *Brucella abortus*, *B.melitensis*, *B.ovis*, *B.suis*; *Campylobacter jejuni*; *Chlamydia suis*; *Chlamydia abortus*, *Ch.felis*; *Cryptococcus neoformans*; *Enterobacter cloacae*, *E.faecalis*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Moraxella catarrhalis*; *Neisseria cinerea*, *N.elongata*, *N.flava*, *N.gonor*, *N.mucosa*, *N.sicca*, *N.subflava*, *N.pantoea agglomerans*; *Pasteurella tularensis*; *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*, *S.typhi*; *Shigella flexneri*, *Sh.sonne*; *Staphylococcus aureus*, различные клинические изоляты *S.aureus* MRSA, *S.faecalis*, *S.saprophyticus*; *S.Streptococcus* A, B, C, G, *S.oralis*, *S.pneumoniae*.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG), Q, SC, D195).  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 7 из 41

Результаты тестирования показали 100 % специфичность как для набора реагентов в варианте FRT, так и в варианте FEP.

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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».
- Инфицированный материал, а также одноразовая пластиковая посуда, соприкасавшаяся с инфицированным материалом, должна сбрасываться на 120 мин в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2% раствор ДП-2Т, на 180 мин в 0,3 % раствор жавелиона или использовать другие хлорсодержащие дезинфицирующие средства.
- 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 односторонним.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG), Q, SC, D195).  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 8 из 41

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

11. Центрифугировать при 12 тыс g в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
13. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
14. Центрифугировать при 12 тыс g в течение 2 мин на микроцентрифуге.
15. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
16. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
17. Добавить в пробирки по 100 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
18. Центрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК и РНК. Образцы готовы к постановке ПЦР.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG), Q, SC, D195).  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 37 из 41

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

## Порядок работы

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре от 60 до 65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) и внести в нее 100 мкл ОК, используя наконечники с фильтром.
3. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести раствор для лизиса и ВКО STI-87 из расчета по 300 и по 10 мкл на пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием. Внести в каждую пробирку с клиническими и контрольным образцами по 310 мкл смеси, используя наконечники с фильтром.
4. Все образцы тщательно перемешать на вихре, затем центрифугировать на микроцентрифуге в течение 30 с при 10 тыс g для удаления капель с крышек пробирок.
5. При экстракции ДНК из мочи смесь раствора для лизиса и ВКО STI-87 внести в центрифужные пробирки с осадком материала, ресуспендировать отдельным наконечником с фильтром для каждого образца и перенести в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф».
6. Содержимое пробирок прогреть 5 мин при 60 °C в термостате, перемешать на вихре и осадить капли жидкости с крышки.
7. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вихре.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 12 тыс g.
9. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP; REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 38 из 41

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.

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

**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 строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

## ЗОНА 1. Экстракция ДНК из клинического материала

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-8» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 4 (формат FEP и формат FRT).
2. Ламинарный бокс (класс биологической безопасности тип II А для лабораторий ПЦР в составе клинико-диагностических лабораторий или тип II В для лабораторий ПЦР в составе противотуберкулезных учреждений).

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP; REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 9 из 41

3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
5. Центрифуга/вихре.
6. Гомогенизатор для тканевых образцов (например, гомогенизатор TissueLyser LT, Qiagen, Германия, центрифуга/вихре «Мультиспин MSC-6000» с ротором RC-1.5, BioSan, Латвия) или фарфоровые ступки с пестиками.
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
8. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема.
9. Механический дозатор переменного объема 1-5 мл.
10. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
11. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл (для работы с центрифугой/вихрем «Мультиспин MSC-6000»).
12. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся конические свободно-стоящие пробирки с объемом 2,0 мл (например, № 72.694.100, Sarstedt, Германия) (для работы с гомогенизатором TissueLyser LT, Qiagen, Германия).
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 (200) мкл и до 1000 мкл.
14. Одноразовые наконечники для дозаторов до 5000 мкл.
15. Штативы для наконечников.
16. Стеклянные или фарфоровые шарики, стерильные, для гомогенизации мокроты (D=3-5 мм) и тканевого материала (D=3 мм).
17. Металлические шарики, стерильные, для гомогенизации тканевого материала (D=5-7 мм).
18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
19. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

## ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. ПЦР-бокс.
2. Центрифуга/вихре.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP; REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 10 из 41

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
9. Добавить в образцы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вихре до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс. g на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
  10. Добавить в образцы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вихре до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировать 30 с при 10 тыс. g на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
  11. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 10, удалить надосадочную жидкость полностью.
  12. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
  13. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вихре. Поместить в термостат при температуре 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вихре.
  14. Центрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Образцы готовы к постановке ПЦР. Пробу переносить аккуратно, не взбалтывая сорбент универсальный.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP; REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196);  
REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 35 из 41

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

## Порядок работы

1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) и внести в нее 100 мкл ОК, используя наконечники с фильтром.
3. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести лизирующий раствор и ВКО STI-87 из расчета по 300 и по 10 мкл на пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием. Внести в каждую пробирку с клиническими и контрольными образцами по 310 мкл смеси, используя наконечники с фильтром.
4. Все образцы тщательно перемешать на вортексе, затем центрифугировать на микроцентрифуге в течение 30 с при 10 тыс g для удаления капель с крышек пробирок.
5. При экстракции ДНК из мочи смесь лизирующего раствора и ВКО STI-87 внести в центрифужные пробирки с осадком материала, ресуспендировать отдельным наконечником с фильтром для каждого образца и перенести в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф».
6. Все образцы прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Если образец растворился не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс g и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.
7. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, оставить в штативе на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
8. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс. g в течение 30 с. Удалить

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D98), REF H-1074-1/ VER 15.02.12 / стр. 34 из 41

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 (200) мкл.
5. Штативы для наконечников и пробирок на 0,5 (0,2) мл.
6. 2 холодильника от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С, соответственно для хранения образцов ДНК и реагентов.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
9. Персональный компьютер для работы с амплификатором (формат FRT) или флуоресцентным ПЦР-детектором (формат FEP).

## При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP:

10. Программируемый амплификатор (например, MaxyGene (Axygen Scientific, США), «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
11. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» и «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
12. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки указанного объема (например, GeneAmp PCR System 2700, MaxyGene) или объемом 0,5 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки указанного объема (например, «Терцик»).

## При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT:

13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000, (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), ICycler IQ или IQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и SmartCycler II в комплекте со специальной центрифугой Mini-Spin (фирмы Cepheid, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D98), REF H-1074-1/ VER 15.02.12 / стр. 11 из 41

14. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл для приборов формата ПЦР режиме «реальное время» с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene для постановки в ротор на 36 пробирок) или с куполообразной крышкой на 0,2 мл для приборов формата ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через крышку (например, ICycler IQ5, Mx3000P, Mx3005, «ДТ-96») или специальные реакционные модули для прибора SmartCycler II.

## ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

## Взятие материала

1. Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ), ликвор собирают в одноразовые плотно закрывающиеся емкости из полипропилена (во избежание адгезии клеток на внутренней поверхности емкости) объемом не менее 5 мл.
2. Мокроту, мочу (среднюю порцию) собирают в одноразовые градуированные закрывающиеся емкости с широким горлом объемом не менее 50 мл.
3. Кровь, плевральную жидкость собирают в пробирки типа Vacuette® с раствором или напылением ЭДТА. Закрытую пробирку с материалом несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант. Для анализа используют цельную кровь, собранную у пациента утром натощак.
4. Менструальную кровь собирают с помощью колпачка Кафка, собранную кровь переносят в сухую одноразовую пробирку.
5. Синовиальную жидкость собирают в сухую одноразовую пробирку.
6. Секрет предстательной железы получают одним из двух способов:
  - а) После окончания массажа предстательной железы ее секрет собирают в одноразовую стерильную пробирку объемом 1,5 мл;
  - б) При невозможности получить секрет – сразу после массажа собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы).

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D98), REF H-1074-1/ VER 15.02.12 / стр. 12 из 41

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для не вскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разуклоптовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» и «ДНК-сорб-С» (кроме лизирующего реагента) хранить при температуре от 2 до 25 °С. Лизирующий реагент хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF), ПЦР-смесь-1-FEP MTC, ПЦР-смесь-1-FRT MTC и фермент UDG (из «ПЦР-комплекта») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FEP MTC и ПЦР-смесь-1-FRT MTC хранить в защищенном от света месте.

**Условия отпуска.** Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)<sup>12</sup>.

Заведующая НПЛ СИДЦЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.М. Родионова

Главный врач ФГБУ «Психиатрия №1»

Управления делами Президента Российской Федерации

Е.Л. Нахичев



<sup>12</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D98), REF H-1074-1/ VER 15.02.12 / стр. 33 из 41

# ФОРМАТ FRT

Принцип интерпретации результатов, полученных для исследуемых образцов:

Таблица 9

## Интерпретация результатов исследуемых образцов

| FAM                  | JOE                           | Валидность результата | Форма выдачи ответа                                                   |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Положительный        | Положительный / отрицательный | Валидный              | <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> обнаружена                  |
| Отрицательный        | Положительный                 | Валидный              | <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> не обнаружена               |
| Отрицательный / > Ct | Отрицательный / > Ct          | Невалидный            | Невалидный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала   |
| > Ct                 | Положительный                 | Невалидный            | Сомнительный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала |

\* значение > Ct для конкретного прибора см. во Вкладыше к ПЦР-комплекту для соответствующего прибора.

В случае получения:

- Положительного результата по каналу FAM и положительного или отрицательного результата по каналу JOE – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* обнаружена.
- Отрицательного результата по каналу FAM и положительного – по каналу JOE – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* не обнаружена.
- Отрицательного результата или результата > Ct (для конкретного прибора) по каналам FAM и JOE свидетельствует о невалидном результате. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как невалидный, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.
- Результата > Ct по каналу FAM и положительного – по каналу JOE – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как сомнительный, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,IQ,SC,D96), REF H-1074-1 / VER 15 02 12 / стр. 32 из 41

7. Тканевой (биопсийный и операционный) материал помещают в пробирки типа Vacuette® с напылением раствора ЭДТА или в одноразовую пробирку, содержащую 0,2 мл стерильного физиологического раствора.

8. Парафиновые блоки нарезают на микротоме или вырезают фрагмент ткани одноразовым скальпелем, удаляют парафин с помощью ксилола, а затем освобождаются от ксилола серией отмывок с понижающейся концентрацией этанола (аналогично стандартной гистологической проводке).

9. Культуры микроорганизмов, выросшие на селективных для микобактерий туберкулеза питательных средах:

а) Плотной – переносят колонии в стеклянные пробирки аналогично работе со стандартом мутности, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе или PBS-буфере.

б) Жидкой – используют оригинальный флакон.

10. Смывы с объектов окружающей среды берут зондами с тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором. Площадь смыва с плоской поверхности составляет 5-10 см². Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, верхнюю часть зонда отмывают и удаляют.

Хранение материала (в случае отсроченного выполнения анализа, резервирования материала для возможной перестановки, а также хранения архивных образцов) возможно по следующей схеме: предполагаемое хранение в течение 3 сут (кроме мочи) – допускается температура от 2 до 8 °С; хранение не более 1 года – допускается температура не выше минус 16 °С; архивирование образцов на срок более 1 года – температура не должна превышать минус 68 °С. Мочу хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч, в дальнейшем – замораживать. Кровь не замораживают. Допускается двукратное замораживание-оттаивание остального клинического материала.

Транспортирование материала осуществляют в термоконтейнере с хладагентом не более 3 сут.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,IQ,SC,D96), REF H-1074-1 / VER 15 02 12 / стр. 13 из 41

32

13

## ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

- Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ) перемешать переворачиванием в исходной емкости. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отобрать 1 мл образца, поместить в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф», промаркировать ее и центрифугировать 10 мин при 10 тыс g. Затем аккуратно удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя 100 мкл образца.
- В емкость с мокротой добавить «Муколизин» (регент производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предобработки мокроты) в соотношении 1:5, ориентируясь по градуировке емкости и стерильные фарфоровые или стеклянные шарики в количестве 3-5 штук. В процессе разжижения мокроты (20-30 мин) емкость необходимо периодически встряхивать. Затем автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отобрать 100 мкл материала, поместить в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» и промаркировать ее.
- Мочу перемешать переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отобрать 5-10 мл образца, поместить в закручивающуюся пробирку, промаркировать ее и центрифугировать 10 мин при 10 тыс g. В случае отсутствия в лаборатории высокоскоростной центрифуги применять центрифугирование в режиме 3 тыс g x 20 мин. Затем аккуратно, с помощью вакуумного отсасывателя, удалить

## ФОРМАТ FRT

о наличии в образце ДНК *M.tuberculosis complex*, по каналу JOE<sup>11</sup> – об адекватном прохождении этапов экстракции и амплификации ВКО.

Оценка результатов анализа контрольных точек.

Результат считается достоверным только в случае соответствия прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК данным таблицы (см. табл. 8).

Таблица 8

## Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Результат амплификации по каналу |               |
|----------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------|
|          |                                      | FAM                              | JOE           |
| OK       | Экстракция ДНК                       | отрицательный                    | положительный |
| K+       | ПЦР                                  | положительный                    | положительный |
| K-       | ПЦР                                  | отрицательный                    | отрицательный |

Результаты не подлежат учету в случае:

- Отсутствия положительного сигнала по каналам FAM или JOE в пробе с положительным контролем ПЦР (K+), что может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется повторная амплификация всех отрицательных образцов, при повторном получении аналогичного результата, необходимо повторить исследование этих образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Наличия положительного сигнала по каналу FAM в одном из отрицательных контролей (K-).

14

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.  
См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для обнаружения микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MTC-FL» вариант FRT ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

#### АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются после окончания работы амплификатора с помощью программного обеспечения используемого прибора, используя установки, указанные во вкладыше к «ПЦР-комплекту» для соответствующего прибора.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (Ct или Cr) в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла (Ct или Cr) для данного канала менее указанного, **отрицательным** – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения Ct или Cr), **сомнительным** во всех остальных случаях.

Положительный результат по каналу FAM<sup>11</sup> свидетельствует

<sup>11</sup> Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 30 из 41

полипропиленовые заворачивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл, положить в них по 2-3 стерильных стеклянных шарика. При использовании **гомогенизатора TissueLyser LT** фрагменты ткани перенести в одноразовые заворачивающиеся пробирки объемом 2,0 мл, положить в них по 1-2 металлических шарика. В случае использования фарфоровых ступок с пестиками поместить в ступку образец ткани и добавить равный объем PBS-буфера или стерильного физиологического раствора и гомогенизировать образец.

- Колонии микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде (ППСр) ресуспендировать в стерильном физиологическом растворе (или PBS-буфере), используя стандарт мутности №5 (5x10<sup>6</sup> м.т./мл) или McFarland № 0,5, 1 или 2. Для исследования используют 5 мкл суспензии. При исследовании культуры, выросшей на жидкой питательной среде (ЖПСр) отобрать аликвоту объемом 1 мл и центрифугировать 10 мин при 1 тыс g, затем удалить надосадочную жидкость.
- Смывы с объектов окружающей среды – для исследования используется 100 мкл раствора.

Таблица 1

Объем проб, используемый для пробоподготовки и экстракции ДНК

| Вид материала                     | Объем аликвоты для пробоподготовки | Объем аликвоты для экстракции ДНК |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Мокрота                           | весь образец                       | 0,1 мл                            |
| БАЛ или ПВБ                       | 1 мл                               | 0,1 мл                            |
| Моча                              | 5-10 мл                            | 0,1 мл                            |
| Ликвор                            | 1 мл                               | 0,1 мл                            |
| Синовиальная жидкость             | 1 мл                               | 0,1 мл                            |
| Секрет простаты                   | 1 мл                               | 0,1 мл                            |
| ППСр                              | 1,5-6x10 <sup>6</sup> м.т./мл      | 0,05 мл                           |
| ЖПСр                              | 1 мл                               | 0,1 мл                            |
| Кровь                             |                                    | 0,1 мл                            |
| Менструальная кровь               |                                    | 0,1 мл                            |
| Ткань                             |                                    | 10-25 мкл                         |
| Смывы с объектов окружающей среды |                                    | 0,1 мл                            |

Необходимо предусмотреть возможное повторное выделение пробы и резервировать аликвоту образца согласно правилам хранения материала.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 15 из 41

#### ФОРМАТ FEP

##### ФОРМАТ FEP

##### СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – включает:

| Реактив                 | Описание                                    | Объем, мл | Кол-во     |
|-------------------------|---------------------------------------------|-----------|------------|
| Лизирующий раствор      | Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup> | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 1   | Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup> | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 2   | Прозрачная бесцветная жидкость              | 50        | 1 флакон   |
| Сорбент универсальный   | Суспензия белого цвета                      | 1,25      | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элиции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость              | 5,0       | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

| Реактив                  | Описание                                        | Объем, мл | Кол-во     |
|--------------------------|-------------------------------------------------|-----------|------------|
| Раствор для лизиса       | Прозрачная жидкость голубого цвета <sup>3</sup> | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость                  | 20        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 3    | Прозрачная бесцветная жидкость                  | 25        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 4    | Прозрачная бесцветная жидкость                  | 10        | 1 флакон   |
| РНК-буфер                | Прозрачная бесцветная жидкость                  | 1,2       | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала, продуктов питания и кормов для животных – включает:

<sup>3</sup> При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса, буфера для лизирующего реагента и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 16 из 41

#### ФОРМАТ FRT

Таблица 5

Программа амплификации «95-65-72 MTC» для приборов роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия))

| Цикл | Температура, °C | Время  | Измерение флуоресценции         | Кол-во циклов |
|------|-----------------|--------|---------------------------------|---------------|
| 1    | 95              | 15 мин | –                               | 1             |
| 2    | 95              | 15 с   | –                               | 5             |
|      | 65              | 30 с   | –                               |               |
|      | 72              | 15 с   | –                               |               |
| 3    | 95              | 15 с   | –                               | 40            |
|      | 65              | 30 с   | FAM, JOE, ROX, Cy5 <sup>4</sup> |               |
|      | 72              | 15 с   | –                               |               |

Таблица 6

Программа амплификации «95-65-72 MTC» для приборов планшетного типа (например, ICycler IQ и IQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия))

| Цикл | Температура, °C | Время  | Измерение флуоресценции         | Кол-во циклов |
|------|-----------------|--------|---------------------------------|---------------|
| 1    | 95              | 15 мин | –                               | 1             |
| 2    | 95              | 15 с   | –                               | 5             |
|      | 65              | 30 с   | –                               |               |
|      | 72              | 15 с   | –                               |               |
| 3    | 95              | 15 с   | –                               | 40            |
|      | 65              | 30 с   | FAM, JOE, ROX, Cy5 <sup>4</sup> |               |
|      | 72              | 15 с   | –                               |               |

Таблица 7

Программа амплификации «95-65-72 MTC» для прибора SmartCycler II (Cepheid, США)

| Цикл | Температура, °C | Время  | Измерение флуоресценции | Кол-во циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------|---------------|
| 1    | 95              | 15 мин | –                       | 1             |
| 2    | 95              | 20 с   | –                       | 45            |
|      | 65              | 50 с   | Optics ON               |               |
|      | 72              | 20 с   | –                       |               |

<sup>4</sup> Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Измерение флуоресценции по каналам ROX и Cy5 не производится при работе на двухканальных приборах, или если в лаборатории не предполагается использование тестов для количественного определения и дифференцирования до вида *Mycobacterium tuberculosis complex*.

<sup>5</sup> Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Измерение флуоресценции по каналам ROX и Cy5 не производится при работе на двухканальных приборах, или если в лаборатории не предполагается использование тестов для количественного определения и дифференцирования до вида *Mycobacterium tuberculosis complex*.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 29 из 41

- амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных (один контроль экстракции, два контроля амплификации).
- В пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь из расчета по 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT MTC, 5 мкл ПЦР-буфера-Flu, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,5 мкл Фермента UDG на одну реакцию. Полученную реакционную смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
  - Внести в каждую пробирку по 15 мкл подготовленной реакционной смеси.
  - В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
  - Поставить контрольные реакции:
    - отрицательный контроль ПЦР (K-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
    - положительный контроль ПЦР (K+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК MTC / STI.
- Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).
- ВНИМАНИЕ!** Для проведения деkontаминации реакционной смеси инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-анализа пробирки 10 – 30 мин при комнатной температуре.
- Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»**
- Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5, 6, 7).

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 26 из 41

| Реактив                        | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| Буфер для лизирующего реагента | Прозрачная бесцветная жидкость | 20        | 1 флакон   |
| Лизирующий реагент             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,85      | 1 пробирка |
| Раствор для отмывки 1          | Прозрачная бесцветная жидкость | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 2          | Прозрачная бесцветная жидкость | 50        | 1 флакон   |
| Сорбент универсальный          | Суспензия Белого цвета         | 1,25      | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элиции ДНК        | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0       | 1 пробирка |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

| Реактив                   | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|---------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ПЦР-смесь-1-FEP MTC       | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28      | 2 пробирки |
| ПЦР-буфер-Flu             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28      | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-Фон             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5       | 1 пробирка |
| Минеральное масло для ПЦР | Бесцветная вязкая жидкость     | 2,0       | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF)         | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03      | 1 пробирка |
| Фермент UDG               | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03      | 1 пробирка |
| ПКО ДНК MTC / STI         | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1       | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер                  | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5       | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG, IQ, SC, D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 17 из 41

## ФОРМАТ FEP

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| Реактив                | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ОКО                    | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,6       | 1 пробирка |
| ВКО STI-87             | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0       | 1 пробирка |
| РНК-буфер <sup>4</sup> | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2       | 1 пробирка |

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- «ДНК-сорб-В» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды;
- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды;
- «ДНК-сорб-С» для экстракции ДНК из тканей человека.

Детальная информация по их использованию изложена в Приложениях 1, 2, 3 к данной инструкции.

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

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

## А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

## ФОРМАТ FRT

| Реактив                | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| РНК-буфер <sup>5</sup> | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2       | 1 пробирка |

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Используются наборы реагентов:

- «ДНК-сорб-В» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды,
- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды,
- «ДНК-сорб-С» для экстракции ДНК из тканей человека.

Детальная информация по их использованию изложена в приложениях 1, 2, 3 к данной инструкции.

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

## А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок, стрипов или плашек для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени». Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

**ВНИМАНИЕ!** До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

- Отобрать необходимое количество пробирок для

<sup>4</sup> Пробирка с РНК-буфером используется для элиции при экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп».

<sup>5</sup> Пробирка с РНК-буфером используется для элиции при экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп».

17

27 9

| Реактив                        | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| Буфер для лизирующего реагента | Прозрачная бесцветная жидкость | 20        | 1 флакон   |
| Лизирующий реагент             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,85      | 1 пробирка |
| Раствор для отмывки 1          | Прозрачная бесцветная жидкость | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 2          | Прозрачная бесцветная жидкость | 50        | 1 флакон   |
| Сорбент универсальный          | Суспензия белого цвета         | 1,25      | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элюции ДНК        | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0       | 1 пробирка |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

| Реактив             | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|---------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ПЦР-смесь-1-FRT MTC | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28      | 2 пробирки |
| ПЦР-буфер-Flu       | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,28      | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF)   | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03      | 1 пробирка |
| Фермент UDG         | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03      | 1 пробирка |
| ПКО ДНК MTC / STI   | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1       | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер            | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5       | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| Реактив    | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ОКО        | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,8       | 1 пробирка |
| ВКО STI-87 | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0       | 1 пробирка |

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,Q,SC,D195), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 26 из 41

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

**ВНИМАНИЕ!** До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл для амплификации исследуемых, контрольных (один контроль экстракции, два контроля амплификации) и фоновых пробирок (2 пробирки «Фон»).
2. Приготовить образцы «Фон». Для каждого из образцов смешать по 10 мкл ПЦР-смеси-1-FEP MTC и по 15 мкл ПЦР-смеси-Фон. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
3. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь из расчета по 10 мкл ПЦР-смеси-1-FEP MTC, 5 мкл ПЦР-буфера-Flu, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,5 мкл Фермента UDG на одну реакцию. Полученную реакционную смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. В подготовленные пробирки для амплификации исследуемых и контрольных проб внести по 15 мкл подготовленной реакционной смеси.
5. На поверхность реакционной смеси всех пробирок, включая контрольные и фоновые, добавить по капле минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. При добавлении проб ДНК при использовании «ДНК-сорб-В» и «ДНК-сорб-С» необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
7. Поставить контрольные реакции:
  - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
  - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК MTC / STI.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,Q,SC,D195), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 19 из 41

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

**ВНИМАНИЕ!** Для проведения деконтаминации реакционной смеси необходимо инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-исследования пробирки 10-30 мин при комнатной температуре.

#### Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации. Программы амплификации «65 MTC» для амплификаторов с активным и матричным регулированием указаны в табл. 2.
2. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить на амплификаторе выполнение программы термоденатурации.

Таблица 2

Программы амплификации «65 MTC»

| Для амплификаторов с активным регулированием <sup>5</sup> |                 |          |        | Для амплификаторов с матричным регулированием <sup>6</sup> |                 |          |        |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|----------|--------|------------------------------------------------------------|-----------------|----------|--------|
| Цикл                                                      | Температура, °C | Время    | Циклов | Цикл                                                       | Температура, °C | Время    | Циклов |
| 1                                                         | 95              | 15 мин   | 1      | 1                                                          | 95              | 15 мин   | 1      |
| 2                                                         | 95              | 15 с     | 45     | 2                                                          | 95              | 20 с     | 45     |
|                                                           | 65              | 20 с     |        |                                                            | 65              | 20 с     |        |
|                                                           | 72              | 15 с     |        |                                                            | 72              | 20 с     |        |
| 3                                                         | 10              | Хранение |        | 3                                                          | 10              | Хранение |        |

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

#### ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели

<sup>5</sup> Например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cycler (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США).

<sup>6</sup> Например, GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США), MaxyGene (Axygen Scientific, США), PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra, Германия).

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,Q,SC,D195), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 20 из 41

#### ФОРМАТ FRT

##### СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – включает:

| Реактив                 | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|-------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| Лизирующий раствор      | Прозрачная бесцветная жидкость | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 1   | Прозрачная бесцветная жидкость | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 2   | Прозрачная бесцветная жидкость | 50        | 1 флакон   |
| Сорбент универсальный   | Суспензия белого цвета         | 1,25      | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0       | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

| Реактив                  | Описание                           | Объем, мл | Кол-во     |
|--------------------------|------------------------------------|-----------|------------|
| Раствор для лизиса       | Прозрачная жидкость голубого цвета | 15        | 1 флакон   |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость     | 20        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 3    | Прозрачная бесцветная жидкость     | 25        | 1 флакон   |
| Раствор для отмывки 4    | Прозрачная бесцветная жидкость     | 10        | 1 флакон   |
| РНК-буфер                | Прозрачная бесцветная жидкость     | 1,2       | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала, продуктов питания и кормов для животных – включает:

<sup>7</sup> При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса, буфера для лизирующего реагента и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °C возможно образование осадка в виде кристаллов.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2; Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,Q,SC,D195), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 25 из 41

25 10

каналу FAM и ниже порогового значения по каналу HEX – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, и в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как невалидный, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации специфической мишени.  
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ВКО.

**ВНИМАНИЕ!** До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к «ПЦР-комплекту», а также методические рекомендации по применению набора реагентов для обнаружения микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® МТС-FL» формат FEP, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

1. Для канала FAM, измеряющего сигнал для специфической мишени, предусмотрена опция 2 пороговых значений – положительного и отрицательного результатов, для канала HEX – единственного порога.
2. Значения ниже порогового значения отрицательного результата принимаются отрицательными, выше порогового значения положительного результата – положительными, между порогами – сомнительными.
3. При получении сомнительного результата детекции требуется повторное проведение анализа данного образца – повторная амплификация, а в случае повторного получения сомнительного результата – повторная экстракция ДНК.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,IQ,SC,D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 24 из 41

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,IQ,SC,D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 21 из 41

#### ФОРМАТ FEP

##### Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 3.

Таблица 3  
Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Сигнал по каналу                                          |                                 | Обозначение результата в программах некоторых детекторов |
|----------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
|          |                                      | FAM                                                       | HEX                             |                                                          |
| OK       | Экстракция ДНК, ПЦР                  | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Выше</u> порогового значения | «-» или «OK»                                             |
| K-       | ПЦР                                  | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения | «нд»                                                     |
| K+       | ПЦР                                  | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | <u>Выше</u> порогового значения | «+» или «OK»                                             |

#### ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал FAM ниже порогового значения положительного результата или по каналу HEX ниже порогового значения, необходимо повторно провести анализ для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, а также для положительного контроля ПЦР (K+), начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу FAM выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, а также для этого/этих контролей, начиная с этапа экстракции ДНК.

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,IQ,SC,D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 22 из 41

#### ФОРМАТ FEP

##### Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Таблица 4  
Интерпретация результатов исследуемых образцов

| FAM                                                                    | HEX                                             | Валидность результата | Форма выдачи ответа                                                   |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <u>Выше</u> порогового значения положительного результата              | <u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения | валидный              | <i>M. tuberculosis complex</i> обнаружена                             |
| <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата              | <u>Выше</u> порогового значения                 | валидный              | <i>M. tuberculosis complex</i> не обнаружена                          |
| Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата | <u>Выше</u> порогового значения                 | невалидный            | сомнительный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала |
| <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата              | <u>Ниже</u> порогового значения                 | невалидный            | невалидный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала   |

В случае получения сигнала:

- Выше порогового значения положительного результата по каналу FAM и выше или ниже порогового значения по каналу HEX – результат валидный - в образце исследуемого материала *M. tuberculosis complex* обнаружена.
- Ниже порогового значения отрицательного результата по каналу FAM и выше порогового значения по каналу HEX – результат валидный - в образце исследуемого материала *M. tuberculosis complex* не обнаружена.
- Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата по каналу FAM и ниже порогового значения по каналу HEX – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как сомнительный, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.
- Ниже порогового значения отрицательного результата по

Формат FEP Форма 4: REF B57-FEP, REF H-1074-2, Формат FRT Форма 4: REF R-B57(RG,IQ,SC,D196), REF H-1074-1 / VER 15.02.12 / стр. 23 из 41

ПРОШИТО В КОЛИЧЕСТВЕ

15 листов

Исполнительный директор

ООО «ХЕМА»

Е.С. Кострикина



*E. Kostrikina*



«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор  
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Варнавичус П.К.

« 10 » \_\_\_\_\_ 2023 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Исполнительный директор ООО «ХЕМА»

Кострикина Е.С.

« 10 » \_\_\_\_\_ 2023 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммунохроматографического выявления  
липоарабиноманнанового антигена микобактерий в биологических жидкостях  
«ХЕМАТест LAMAg»

## 1. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ.

### 1.1. Описание назначения:

а) Набор реагентов для иммунохроматографического выявления липоарабиноманнанового антигена микобактерий в биологических жидкостях «ХЕМАТест LAMAg» предназначен для качественного выявления липоарабиноманнанового антигена микобактерий в спинномозговой жидкости (СМЖ), моче и сыворотке крови методом иммунохроматографического анализа.

### б) Функциональное назначение.

Выявление липоарабиноманнанового антигена микобактерий (ЛАМ) в биологических жидкостях используется в качестве вспомогательного метода для быстрой предварительной диагностики туберкулеза у пациентов с Т-клеточными иммунодефицитами.

в) Липоарабиноманнан является липогликаном и основным фактором вирулентности бактерий рода *Mycobacterium*. Он является основным компонентом клеточной стенки, служит модулем с иммунорегуляторным и противовоспалительным действием. Это позволяет бактерии поддерживать выживание в человеческом резервуаре, подрывая устойчивость хозяина и приобретенные иммунные реакции.

В клинической практике определение ЛАМ используется для диагностики выявления активной формы туберкулеза при врожденном или приобретенном функциональном дефиците Т-клеточной системы иммунитета - у ВИЧ-инфицированных или получающих иммуносупрессивную терапию, и имеющих высокий риск развития или клинические симптомы туберкулеза, по месту оказания помощи. На поздних стадиях, особенно в сочетании с ВИЧ, туберкулез переходит из легочной фазы в фазу системного заражения, что усложняет клиническую картину и диагностику заболевания. Отсутствие отделяемой мокроты у таких пациентов делает невозможной традиционную диагностику туберкулеза. Известно, что бактериальные и грибковые инфекции легких, которые перешли в системную инвазивную стадию, могут быть диагностированы путем обнаружения их полисахаридных антигенов.

г) В качестве анализируемого образца используется спинномозговая жидкость (СМЖ), моча и сыворотка крови.

д) Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.2. Набор реагентов «ХЕМАТест LAMAg» предназначен для одноразового использования.

1.3. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

1.4. Набор реагентов «ХЕМАТест LAMAg» предназначен для диагностики *in vitro*.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 2.1. Принцип работы Набора.

Определение основано на принципе иммунохроматографического анализа. Анализируемый образец абсорбируется поглощающим участком на поверхность тест-полоски. Во время проведения анализа антиген из образца связывается с антителами к ЛАМ, нанесенными на поверхность

нанесенных микрочастиц, и с антителами к ЛАМ, нанесенными на поверхность тест-полоски. В результате образуется комплекс, видимый в форме цветной линии.

2.2. В комплект поставки входят:

- Набор реагентов «ХЕМАТест LAMAg»
- паспорт (один на транспортную тару или групповую упаковку).

2.3. Состав Набора, описание компонентов:

| Состав                          |                    | Описание, готовность компонентов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Наименования компонента         | Количество (объем) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Кассета                         | 6 шт.              | Кассета из белого пластика (с тест-полоской внутри), прямоугольной формы с двумя отверстиями: для нанесения исследуемого образца (маркировка «S») и тестовая зона (с маркировками «Т» и «С»), в индивидуальной упаковке из полимерных материалов (с основой из алюминиевой фольги) с осушителем (длина $12 \pm 1,0$ см, ширина $7,0 \pm 1,0$ см), готова к использованию |
| Буфер для обработки образца     | 1 шт. (3,0 мл)     | Флакон с прозрачной бесцветной жидкостью, готов к использованию                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Буфер для нейтрализации образца | 1 шт. (0,5 мл)     | Флакон с прозрачной бесцветной жидкостью, готов к использованию                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Инструкция по применению        | 1 шт.              | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

2.4. Одна кассета предназначена для проведения одного выявления ЛАМ в СМЖ, моче или сыворотке крови человека.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность (предел обнаружения).

Минимально достоверно определяемая концентрация ЛАМ:

- спинномозговая жидкость (СМЖ) – 1,0 нг/м л;
- моча – 1,0 нг/мл;
- сыворотка крови – 1,0 нг/мл.

3.2. Аналитическая специфичность.

Образцы сыворотки крови, СМЖ, мочи, полученные от пациентов с различными потенциально интерферирующими инфекционными антигенами, были протестированы с помощью Набора «ХЕМАТест LAMAg».

Ни одна из испытанных проб не показала наличие перекрёстной реактивности.

| Предполагаемые влияющие факторы | Перекрёстная реакция |
|---------------------------------|----------------------|
| <i>Aspergillus</i>              | отсутствует          |
| <i>Candida albicans</i>         | отсутствует          |
| <i>Candida glabrata</i>         | отсутствует          |
| <i>Candida krusei</i>           | отсутствует          |
| <i>Candida tropicalis</i>       | отсутствует          |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>  | отсутствует          |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | отсутствует          |
| <i>Haemophilus influenzae</i>   | отсутствует          |
| <i>Klebsiella pneumonia</i>     | отсутствует          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | отсутствует          |
| <i>Enterococcus faecalis</i>    | отсутствует          |
| <i>Enterococcus faecium</i>     | отсутствует          |
| <i>E.coli</i>                   | отсутствует          |

### 3.3. Интерференция.

На результаты анализа не влияло наличие в сыворотке крови: гемоглобин (до 200 г/л), триглицериды (до 250 мг/дл), холестерин (до 220 мг/дл), билирубин (до 15 мг/дл), общий белок (до 90 г/л); в СМЖ: хлориды (до 140 ммоль/л), эритроциты (до  $30 \cdot 10^6$ /л), глюкоза (до 3,9 ммоль/л), белок (до 12 г/л), лейкоциты (до 12 г/л), цитоз (до 700 кл/мкл); в моче: мочевины ( $<500$  ммоль/л), уробилиноген (3,5 мкмоль/л), кетоновые тела ( $<16$  ммоль/л), креатинин ( $<10$  мг/дл), глюкозу ( $<250$  ммоль/мл), нитриты ( $<0,3$  мг/дл), лейкоциты ( $<500$  лейкоцитов/мкл), pH в диапазоне ( $<9,5$ ), билирубин ( $<375$  ммоль/мл), гемоглобин ( $<210$  ммоль/мл), гаммаглобулин ( $<210$  мкг/мл).

### 3.4. Время проведения анализа.

Общее время выявления липоарабиноманнанового антигена микобактерий методом иммунохроматографического анализа с использованием Набора реагентов «ХЕМАТест LAMAg» составляет 15-30 мин.

### 3.5. Объем исследуемого образца.

Для выявления липоарабиноманнанового антигена микобактерий методом иммунохроматографического анализа с использованием Набора реагентов «ХЕМАТест LAMAg» требуется не более 80 мкл исследуемого образца.

### 3.6. Клиническая проверка.

Для подтверждения диагностических характеристик было исследовано 898 образцов биологической жидкости. По данным исследования диагностическая чувствительность 74,6% (ДИ 95%: 62,5% - 83,4%) с доверительной вероятностью 95%, диагностическая специфичность 80,1% (ДИ 95%: 66,8% - 94,9%) с доверительной вероятностью 95%.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2б.

4.2. Для использования в диагностики *in vitro*.

4.3. Все компоненты Набора являются нетоксичными.

4.4. **Внимание!** Использовать строго согласно Инструкции по применению. Не принимать внутрь!

4.5. К работе с материалом, микобактериями (III - IV группы), допускаются лаборатории, имеющие специальное разрешение в соответствии с федеральными санитарными правилами, нормами и гигиеническими нормативами, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с п. 319 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

4.6. Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", СанПиН

3.684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарнопротивоэпидемических (профилактических) мероприятий".

4.7. При работе следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905 (ISO 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.8. Лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы, а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое. Лабораторное оборудование и принадлежности, которые используются при работе с Набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.9. Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических или механических дозаторов с фильтром. Одноразовые пластиковые материалы (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор с последующей утилизацией (см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

4.11. Не использовать по истечении срока годности. Не использовать, если упаковка повреждена или плохо запаена. Перед применением убедиться в целостности компонентов Набора.

4.12. На результаты анализа с использованием Набора реагентов могут влиять такие факторы как неточность выполнения анализа или отступление от инструкции.

4.13. Набор реагентов «ХЕМАТест LAMAg» не содержит лекарственных средств для медицинского применения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

4.14. При использовании согласно инструкции по применению изделие является безопасным (не несет физических, экологических и иных рисков).

4.15. Показания к применению медицинского изделия: применять в соответствии с назначением.

4.16. Противопоказания к применению медицинского изделия: противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет. Не применять не по назначению.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.

- центрифуга;
- тепловой блок или водяная баня;
- вортекс;
- часы, таймер или секундомер;
- дозаторы со сменными наконечниками;
- перчатки медицинские одноразовые.
- одноразовые пробирки (пробирки типа эппендорф (Eppendorf)).

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

В качестве анализируемого образца используется спинномозговая жидкость (СМЖ), моча и сыворотка крови.

### 6.1. Процедура получения анализируемого материала.

Сбор образцов проводить в соответствии с приказом Министерства Здравоохранения РФ №109 от 21 марта 2003 г.

6.1.1. Сбор образцов крови следует проводить в соответствии с текущей практикой методом венепункции (венозная кровь), соблюдая стандартные лабораторные процедуры. Для анализа использовать цельную сыворотку крови.

6.1.2. Сбор образцов СМЖ и мочи проводить в соответствии с методикой сбора образца.

6.1.3. Выбор пробирок для получения сыворотки крови, СМЖ и мочи, подготовку биологических жидкостей, центрифугирование, хранение и транспортировку образца производить согласно правилам проведения преаналитического этапа, утвержденным для лаборатории.

### 6.2. Приготовление сыворотки крови пациентов.

6.2.1. Кровь отобрать венепункцией в одноразовую вакуумную или многоразовую стерильную с плотно закрывающейся крышкой пробирку для получения сыворотки (согласно правилам ОРГ преаналитического этапа и МУ лабораторий), инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Центрифугировать 10 минут при оборотах 1500-2000 в минуту.

6.2.2. Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить сыворотку от сгустка.

6.2.3. Образцы с гемолизом, гиперлипидемией или очевидным бактериальным проростом, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта, исследованию не подлежат.

6.2.4. Образцы сыворотки крови транспортируют и хранят в закрытых пробирках без доступа воздуха при температуре +2–8°C в течение 5 суток. Допускается хранение сыворотки крови при температуре -20°C и ниже не более 2 месяцев. Допускается не более чем двукратное замораживание-размораживание образцов сыворотки. Открытые образцы можно хранить при температуре +2–8°C не более 48 часов.

### 6.3. Приготовление анализируемых образцов СМЖ.

#### 6.3.1. СМЖ отобрать методом люмбальной пункции.

6.3.2. Для исследования СМЖ собирают в стерильную пробирку без консервантов с соблюдением правил асептики. Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки. Предварительная обработка проб не требуется.

6.3.2. Если анализ проводится не в день взятия, закрытую пробирку с образцом следует хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  в течение 5 суток или при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 2 месяцев. Вскрытая пробирка хранится при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов. Допускается однократное замораживание/оттаивание материала.

### 6.4. Приготовление анализируемых образцов мочи.

6.4.1. Для тестирования рекомендуется использовать утреннюю мочу (среднюю порцию). Мочу собрать в чистый контейнер, тщательно перемешать, не центрифугировать.

6.4.2. Если анализ проводится не в день взятия, закрытую пробирку с образцом следует хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток или при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 2 месяцев. Замороженные образцы после размораживания следует тщательно перемешать. Вскрытая пробирка хранится при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  в течение 12 часов.

6.4.3. Образцы, хранившиеся вне холодильника более 12 часов, а также образцы имеющие признаки бактериального роста, не должны использоваться для анализа.

## 7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы следует выдержать при комнатной температуре  $+18-25^{\circ}\text{C}$  не менее 30 мин.

### 7.2. Приготовление анализируемых образцов сыворотки или СМЖ.

7.2.1. В одноразовую пробирку типа эппендорф на 1,5 мл добавьте 300 мкл каждой исследуемой сыворотки или СМЖ.

7.2.2. Добавьте 100 мкл Буфера для обработки образцов в каждую пробирку.

7.2.3. Тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе. Плотнo закройте пробирку, чтобы предотвратить вскрытие при нагревании.

7.2.3.1. Вариант 1. Тепловой блок: нагреть центрифужную пробирку в течение 3 минут в тепловом блоке при  $+100^{\circ}\text{C}$ . Пробирки должны быть размещены в блоке только при достижении заданной температуры.

7.2.3.2. Вариант 2: Водяная баня: нагреть пробирки в течение 3 минут при  $+100^{\circ}\text{C}$ . Пробирки необходимо размещать на водяной бане только при достижении заданной температуры.

7.2.4. После тепловой обработки пробирки центрифугировать при 10 000 g в течение 10 минут при температуре  $+20-25^{\circ}\text{C}$ .

7.2.5. Отобрать 100 мкл супернатанта (надосадочная жидкость) сыворотки или СМЖ в чистую одноразовую пробирку и добавить в 10 мкл Буфера для нейтрализации образца.

Подготовленный образец использовать в анализе. Обработанные образцы не хранятся!

### 7.3. Приготовление анализируемых образцов мочи.

7.3.1. Отберите образец мочи в одноразовую или многоразовую стерильную пробирку с плотно закрывающейся крышкой, тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе. Плотнo закройте пробирку, чтобы предотвратить вскрытие при нагревании.

7.3.1.1. Вариант 1. Тепловой блок: нагреть центрифужную пробирку в течение 3 минут в тепловом блоке при  $+100^{\circ}\text{C}$ . Пробирки должны быть размещены в блоке только при достижении заданной температуры.

7.3.1.2. Вариант 2. Водяная баня: нагреть пробирки в течение 3 минут при  $+100^{\circ}\text{C}$ . Пробирки необходимо размещать на водяной бане только при достижении заданной температуры.

7.3.2. После тепловой обработки пробирки центрифугировать при 10 000 g в течение 10 минут при температуре  $+20-25^{\circ}\text{C}$ . Отобрать супернатант для анализа.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Извлеките Кассету из упаковки и поместите ее на сухую горизонтальную плоскость тестовой поверхностью вверх.

8.2. С помощью дозатора или одноразовой пластиковой пипетки внесите 80 мкл (3–4 капли) тестируемого подготовленного образца в окошко для образца (S) Кассеты.

8.3. Во время проведения теста не трогайте и не перемещайте Кассету.

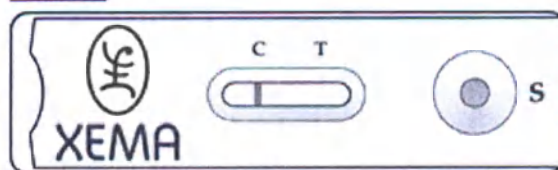
## 9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

**ВНИМАНИЕ!** Считывание результатов проводите через 15 минут после внесения исследуемого образца, но не позднее 30 минут. Регистрация результатов анализа по истечении более чем 30 минут недопустима, такие результаты являются недостоверными.

### 9.1. Отрицательный результат.

Присутствие в тестовой зоне одной окрашенной полосы указывает на отрицательный результат. Это означает, что или липоарабиноманновый антиген микобактерий отсутствует в образце, или его концентрация ниже порогового значения.

Кассета



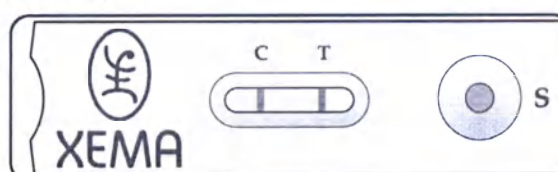
C – контрольная линия

T – тестовая линия

### 9.2. Положительный результат.

Присутствие в тестовой зоне двух окрашенных полос независимо от того, какая полоса появилась первой, указывает на положительный результат. Это означает, что содержание липоарабиноманнового антигена микобактерий равно или выше порогового значения.

Кассета



C – контрольная линия

T – тестовая линия

### 9.3. Неправильный результат.

Отсутствие каких-либо видимых полос после проведения анализа указывает на неправильный результат. Причиной может быть неправильное выполнение процедуры анализа или непригодность Кассеты для анализа. Рекомендуется протестировать образец пациента повторно используя новую Кассету и тщательно соблюдая все описанные в инструкции условия.

9.4. Положительный результат анализа не может служить основанием для постановки диагноза и должен использоваться в комплексе с клиническим наблюдением и другими методами диагностики!

## 10. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

10.1. Несоблюдение процедур тестирования и интерпретации результатов может отрицательно сказаться на процессе тестирования и (или) привести к получению недостоверных результатов.

10.2. Отрицательный результат тестирования не исключает инфицирования туберкулезом. Получение отрицательного результата тестирования может свидетельствовать о том, что уровень липоарабиноманнанового антигена микобактерий (ЛАМ) в образце ниже предела обнаружения или указывать на то, что образцы были собраны неправильно.

10.3. Как положительный, так и отрицательный результат необходимо подтвердить другими методами диагностики. Тест не может дифференцировать микобактерии туберкулеза от других микобактерий. Тест не предоставляет данных о лекарственной чувствительности.

10.4. Выявление липоарабиноманнанового антигена микобактерий (ЛАМ) в СМЖ может быть использовано для диагностики туберкулеза. Выявление ЛАМ в других биологических жидкостях (моче и сыворотке крови) должно быть подтверждено последующим клиническим исследованием.

10.5. Набор реагентов «ХЕМАТест LAMAg» предназначен только для качественного тестирования. Количественное содержание должно быть измерено с помощью других методов.

## 11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

11.1. В качестве контроля результата анализа выступает присутствие контрольной полосы – окрашенной линии, появляющейся на уровне маркировки «С» тестовой линии, – что указывает на достаточный объем образца.

11.2. Контрольная полоса появляется во всех случаях правильного выполнения процедуры анализа.

## 12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

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

12.1. Транспортирование.

12.1.1. Транспортирование Набора реагентов «ХЕМАТест LAMAg» должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре + 2-30°C.

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

12.1.3. Свойства компонентов Набора допускают его немедленное применение для анализа после транспортирования.

## 12.2. Хранение.

12.2.1. Набор реагентов «ХЕМАТест LAMAg» должен храниться в оригинальной упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-30°C в течение всего срока годности – 36 мес.

12.2.2. Не допускается замораживание целого Набора.

12.2.3. Кассета после вскрытия индивидуальной упаковки хранится 1 час при условии соблюдения комнатной температуры (+18-25°C) и влажности не более 75%.

12.2.4. Буфер для обработки образца и Буфер для нейтрализации образца после вскрытия хранить при температуре +2-30°C в течение всего срока годности.

12.2.5. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

## 12.3. Эксплуатация.

Потенциальный потребитель - Набор предназначен для использования персоналом клинико-диагностических лабораторий не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим образованием, прошедшим соответствующую профессиональную подготовку в области используемых методов и методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами I-IV групп патогенности.

12.3.1. Набор должен применяться согласно Инструкции по применению.

12.3.2. После вскрытия индивидуальной непрозрачной упаковки с Кассетой, анализ должен быть произведен в течение 1 часа при условии соблюдения комнатной температуры (+18-25°C) и влажности не более 75%.

12.3.3. Все компоненты Набора реагентов «ХЕМАТест LAMAg» при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности.

12.3.4. Не используйте Набор с истекшим сроком годности. Срок годности Набора указан, на внешней стороне упаковки.

12.3.5. Кассета предусматривает только однократное применение. Не используйте Кассету, если упаковка повреждена.

12.3.6. Исключить прямое воздействие солнечных лучей на кассету во время проведения исследования.

12.3.7. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры постановки анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

12.3.7. Не использовать компоненты набора повторно.

## 12.4. Утилизация.

12.4.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

12.4.2. Медицинские отходы класса А, Б, В. Утилизацию или уничтожение наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий", СанПиН 2.1.7.2527-09 (2.1.7.728-99) «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

12.4.3. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

## 13. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.

Предприятие-изготовитель гарантирует стабильность компонентов и Набора, а также соответствие Набора требованиям технической документации при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «ХЕМАТест LAMAg», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, тел/факс: (495) 510-57-07.

## 14. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванеева Т.В., Куликовская Н.В., Краснова М.А. и др. Результаты применения иммунологических методов диагностики туберкулеза *in vivo* и *in vitro* у больных ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2016. – № 2. – С. 66-71.
2. Васильева Е.В., Пантелеев А.М., Вербов В.Н., Тололян А.А. Значение квантиферонового теста и IP-10 в диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // Мед. иммунология (Иммунология туберкулеза, специальный выпуск). – 2015. – Т. 17. – С. 131-132.
3. Манина В.В. Старшинова А.А., Пантелеев А.М. и др. Значение иммунологических тестов в диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // Мед. альянс. – 2015. – № 1. – С. 220-221.
4. Abebe M., Holm-Hansen C., Wiker H.G., Bjune G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Scand. J. Immunology*. – 2007. – Vol. 66. – P. 176-191.
5. Achkar J.M., Jenny-Avital E., Yu X. et al. Antibodies against immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in subjects with suspected tuberculosis in the United States compared by HIV status // *Clin. Vaccine Immunology*. – 2010. – Vol. 17. – P. 384-392.
6. Briken V., Porcelli S.A., Besra G.S., Kremer L. *Mycobacterial* lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response // *Mol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 53. – N. 2. – P. 391-403.
7. Lawn S.D., Butera S.T., Folks T.M. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2001. – Vol. 14. – P. 753-777.
8. Lawna S.D., Gupta-Wright A. Detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine is indicative of disseminated TB with renal involvement in patients living with HIV and advanced immunodeficiency: evidence and implications // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 2016. – Vol. 110. – P. 180-118.
9. Liu M., Guo S., Hibbert J.M. et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2011. – Vol. 22. – P. 121-130.
10. Toossi Z. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease // *J. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 188. – P. 146-155.
11. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 29 декабря 2014 г. № 951 "Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания".

# 15. СИМВОЛЫ, НАНОСИМЫЕ НА УПАКОВКУ НАБОРА

| Символ                                                                              | Значение символа                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|    | Изготовитель                                        |
|    | Дата изготовления                                   |
|    | Использовать до                                     |
|    | Код партии (номер серии)                            |
|    | Номер по каталогу                                   |
|    | Не допускать воздействия солнечного света           |
|    | Беречь от влаги                                     |
|    | Предел температуры                                  |
|    | Обратитесь к инструкции по применению               |
|   | Осторожно!                                          |
|  | Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i> |
|  | Содержимого достаточно для проведения n тестов      |
|  | Не использовать при повреждении упаковки.           |
|  | Запрет на повторное применение                      |
|  | Буфер для образца                                   |
|  | Буфер для нейтрализации образца                     |

Начальник отдела производства реагентов  
и контрольных препаратов ООО «ХЕМА»

«10» 05 2023 г.



Чуканов С.В.



ПРОШИТО В КОЛИЧЕСТВЕ

12 листов

Исполнительный директор

ООО «ХЕМА»

Е.С. Кострикина

ПРОШИТО

В КОЛИЧЕСТВЕ 12 листов

«10» 05 2023 г.

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Варнавичус П.К.

