

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека



В.Г. Акимкин

« 04 » июля 20 23 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

AmpliSens® MTBc-diff

AmpliSens®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	5
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	10
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	19
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	24
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	26
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	27
ФОРМА FRT-96F	29
СОСТАВ.....	29
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	29
А. Подготовка проб для амплификации	30
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	31
В. Анализ и интерпретация результатов.....	32
ФОРМА FRT-96L и FRT-96L-t	36
СОСТАВ.....	36
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	36
А. Подготовка проб для амплификации	37
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	38
В. Анализ и интерпретация результатов.....	39
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	43
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	44
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	45

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхоальвеолярная лаважная жидкость
ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
МБТ (MTBc)	- микобактерии туберкулеза (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex)
м.т.	- микробные тела
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПВБ	- промывные воды бронхов
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
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
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
С-	- отрицательный контрольный образец
PCR C+	- положительный контрольный образец этапа ПЦР
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов AmpliSens® MTBc-diff предназначен для дифференциации микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBc) – до вида: человеческого (*M.tuberculosis*) и бычьего (*M.bovis*) или вакцинного штамма (*M.bovis* BCG) – в биологическом материале (мокрота, промывные воды бронхов (бронхоальвеолярная лаважная жидкость), моча, плевральная жидкость, асцитическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), фекалии, жидкое или плотное содержимое некротического характера из различных органов и тканей, тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках), в культурах микроорганизмов, выделенных при посеве биологического материала человека, методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов

амплификации.

Набор реагентов может применяться для исследования смывов с объектов окружающей среды при проведении профилактических мероприятий с целью предотвращения заболевания человека туберкулезом.

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения и/или количественного определения ДНК *MTB*с в исследуемых образцах (например, с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® *МТC-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), *Xpert® MTB/RIF* (Cepheid, США)). Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Рекомендации по отбору проб и количеству рекомендуемых повторов для исследования указаны в разделе «Ограничения по использованию проб исследуемого материала» и во вкладыше к настоящему набору реагентов.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны проводиться врачом соответствующей специализации.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике туберкулеза, вне зависимости от формы заболевания, а также в патологоанатомической практике при исследовании тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках для прижизненной или посмертной диагностики. Набор реагентов может быть использован для исследования смывов с объектов окружающей среды при проведении профилактических мероприятий.

Дифференциация видов и вакцинного штамма *MTB*с важна для уточнения этиологии заболевания и определения источника заражения.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются медицинские работники с высшим профильным образованием (например,

врачи-бактериологи, врачи-медицинские микробиологи, врачи клинической лабораторной диагностики, биологи), специалисты со средним медицинским образованием (например, медицинские технологи, медицинские лабораторные техники (фельдшера-лаборанты), лаборанты), допущенные к работе в лаборатории и обученные методам молекулярной диагностики в установленном законодательством порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК одного из видов/штаммов *MTB*s (*M.tuberculosis*, *M.bovis* или *M.bovis* BCG) и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация четырех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Сy5
ДНК-мишень	ДНК <i>M.tuberculosis</i>	ДНК <i>M.bovis</i> / ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	Регион RD9	Регион RD1	Регион RD1	Искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Таблица 2

Характеристика	Форма FRT-96F	Форма FRT-96L	Форма FRT-96L-t
Число реакций амплификации, включая контроли	96	96	96
Реагент Mix-MTBc-diff	да	нет	нет
Реагент Mix-MTBc-diff-Lyo в стрипованных пробирках объемом 0,2 мл на одну реакцию	нет	да	нет
Реагент Mix-MTBc-diff-Lyo в пробирках объемом 0,2 мл на одну реакцию	нет	нет	да
Тип амплификатора	планшетный и роторный	планшетный	планшетный и роторный

Формы FRT-96F, FRT-96L, FRT-96L-t предназначены для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 3

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ (м.т.)/мл
Мокрота	100	«РИБО-преп»	1x10³
ПВБ (БАЛ)			
Моча			
Плевральная жидкость			
Асцитическая жидкость			
Спинномозговая жидкость (ликвор)			
Фекалии			
Содержимое некротического характера			
Смывы с объектов окружающей среды			
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках	Образец обработанной ткани		
Мокрота	200	«МАГНО-сорб»	1x10³
ПВБ (БАЛ)			
Моча			
Плевральная жидкость			
Асцитическая жидкость			
Спинномозговая жидкость (ликвор)			
Фекалии			
Содержимое некротического характера			
Смывы с объектов окружающей среды			
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках	Образец обработанной ткани		

Примечание – Один геномный эквивалент (геном) соответствует одному микробному телу (м.т.).

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК *M.tuberculosis*, *M.bovis* или вакцинного штамма *M.bovis* BCG, входящих в группу *Mycobacterium tuberculosis* complex. Аналитическая специфичность набора реагентов подтверждена при тестировании штаммов и клинических изолятов различных

микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^7 ГЭ (м.т.)/мл и геномной ДНК человека в концентрации не менее 10^5 копий/мл:

- микобактерии, принадлежащие к группе *Mycobacterium tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG;
- нетуберкулезные микобактерии: *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marianum*, *M. marinum*, *M. paratuberculosis*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*;
- бактерии, принадлежащие к другим родам и семействам: *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria flava*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia enterocolitica*.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования отрицательных и искусственно инфицированных положительных образцов. Положительные образцы представляли собой разведение суспензии штамма H37Ra *M. tuberculosis* и разведение суспензии штамма *M. bovis* BCG. В качестве отрицательного образца был использован реагент С–.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с

использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Форма комплектации	Тип образцов	Искусственно инфицированы штаммами	Повторяемость		Воспроизводимость	
			Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Форма FRT-96F	Положительные	<i>M. bovis</i> BCG	22	100	88	100
	Положительные	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	20	100	80	100
	Отрицательные	-	22	100	88	100
Форма FRT-96L	Положительные	<i>M. bovis</i> BCG	22	100	88	100
	Положительные	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	20	100	80	100
	Отрицательные	-	22	100	88	100
Форма FRT-96L-t	Положительные	<i>M. bovis</i> BCG	22	100	88	100
	Положительные	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	20	100	80	100
	Отрицательные	-	22	100	88	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 5

Результаты тестирования набора реагентов AmpliSens® MTBc-diff в сравнении с референтным методом

Вид исследуемого материала	Выявляемый патоген	Результаты применения AmpliSens® MTBc-diff		Результаты применения референтного метода ¹	
				Положительных	Отрицательных
Образцы ДНК, экстрагированные из образцов разных видов биологического материала, культур микроорганизмов, выделенных при посеве биологического материала человека ²	<i>M.tuberculosis</i>	Всего исследовано 720 образцов	Положительных	216	0
			Отрицательных	0	504
	<i>M.bovis</i>	Всего исследовано 720 образцов	Положительных	162	0
			Отрицательных	0	558
	<i>M.bovis</i> BCG	Всего исследовано 720 образцов	Положительных	162	0
			Отрицательных	0	558

¹ В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® MTC-diff-FL» (ПУ № ФСР 2012/13301).

² Биологический материал, культуры микроорганизмов, выделенные при посеве биологического материала человека, в которых обнаружена или не обнаружена ДНК MTBc с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® MTC-FL», Xpert® MTB/RIF.

**Диагностические характеристики набора реагентов
AmpliSens® MTBc-diff**

Вид исследуемого материала	Выявляемый патоген	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 %)
Образцы ДНК, экстрагированные из образцов разных видов биологического материала, культур микроорганизмов, выделенных при посеве биологического материала человека	<i>M.tuberculosis</i>	100 (98,31 - 100) %	100 (99,27-100) %
	<i>M.bovis</i>	100 (97,75-100) %	100 (99,34-100) %
	<i>M.bovis</i> BCG	100 (97,75-100) %	100 (99,34-100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 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» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории должна быть от 20 до

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.

- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями 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,

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Перечисленные ниже дополнительные материалы и оборудование, относящиеся к категории медицинских изделий и зарегистрированные на территории Российской Федерации или Евразийского экономического союза, не имеют ограничений по совместному использованию с данным набором реагентов, кроме позиций, для которых указаны конкретные примеры.

Взятие исследуемого материала

Для мокроты, ПVB (БАЛ), мочи, плевральной жидкости, асцитической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), фекалий, содержимого некротического характера из различных органов и тканей:

1. Стерильный пластиковый контейнер объемом не менее 20 мл и диаметром отверстия не менее 35 мм для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов.

Для тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках:

2. Забуференный формалин для фиксации тканей или специализированные растворы, предназначенные для фиксации ткани с целью последующих молекулярно-биологических исследований.
3. Одноразовые стерильные скальпели или одноразовые скарификаторы.
4. Одноразовые заворачивающиеся полипропиленовые пробирки объемом 2 мл с винтовой горловиной, с коническим дном и юбкой устойчивости (свободностоящие) с крышками, снабженными уплотняющей кольцевой прокладкой и петлями, необходимыми для прикрепления крышки.

Для культур микроорганизмов, выделенных при посеве биологического материала человека на питательные среды:

5. Одноразовые закручивающиеся полипропиленовые пробирки объемом 1,5-2 мл с винтовой горловиной, коническим дном и крышками, снабженными уплотняющей кольцевой прокладкой.
6. Пастеровская пипетка объемом не менее 3 мл.
7. Петля микробиологическая, 1-10 мкл.
8. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).

Для смывов с объектов окружающей среды:

9. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) – в случае последующего проведения ПЦР-исследования с экстракцией ДНК.
10. Реагент 1-кратный ТЕ-буфер (10 мМ Трис/HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) – в случае последующего проведения ПЦР-исследования без экстракции ДНК.
11. Одноразовые тампоны-зонды для взятия смывов.
12. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5-2,0 мл.
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и 1000 мкл.
14. Штативы для пробирок объемом 1,5-2,0 мл.

Предварительная подготовка исследуемого материала

Для мокроты, ПVB (БАЛ), мочи, плевральной жидкости, асцитической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), фекалий, содержимого некротического характера из различных органов и тканей:

15. Реагент «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты и других образцов со слизью – в случае последующего проведения только ПЦР-исследования.
16. Реагент для пробоподготовки и деkontаминации мокроты (BBL Mycoprep Kit) NALC/NaOH BD BBL™ MGIT™ (Becton Dickinson and Company («Бектон Дикинсон энд Компани»), США) (РУ № ФСЗ 2009/04403) или 10% водный раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия (Na_3PO_4) – в случае последующего проведения комплексного микробиологического и ПЦР-исследования.
17. Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 15 мл.

18. Пастеровская пипетка объемом не менее 3 мл.
19. Центрифуга медицинская лабораторная с ротором для пробирок объемом 15 мл.

Для тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках:

20. Термошейкер для микропробирок и ПЦР-планшетов.
21. о-Ксилол химически чистый (хч) или промышленно производимый депарафинизирующий реагент.
22. 96% раствор этанола, 70% раствор этанола.

Для культур микроорганизмов, выделенных при посеве биологического материала человека на плотные питательные среды:

23. Вортекс для подготовки суспензии культуры.
24. Оптический отраслевой стандарт мутности (ОСО мутности) или Стандарт мутности McFarland.
25. Пустые пробирки, диаметр, толщина стенок и цвет стекла которых точно соответствуют пробиркам-эталонам используемого стандарта мутности.

Общие материалы и оборудование:

26. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл.
27. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
28. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.
29. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
30. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
31. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл.
32. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
33. Вортекс.
34. Автоматические дозаторы переменного объема.
35. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
36. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
37. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

38.Комплект реагентов для экстракции ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265).

39.Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

40.Автоматическая станция для экстракции НК (например, KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific Oy («Термо Фишер Сайентифик Ой»), Финляндия (РУ № ФСЗ 2009/05562)), AutoPure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. (ООО «Ханчжоуская компания инструментов Аошэн»), Китай (РУ № РЗН 2022/16430))).

41.Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)).

42.Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции в соответствии с рекомендациями производителя.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

43.Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с формой FRT-96F:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл для приготовления реакционной смеси;

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками, или 96-луночные полипропиленовые планшеты для ПЦР – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.

44.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.

45.Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.

46.Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

47. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
48. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
49. Вортекс.
50. Специальные насадки на вортекс для осаждения капель смеси в стрипах перед постановкой в амплификатор планшетного типа.
51. Автоматические дозаторы переменного объема.
52. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)).
53. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16° С (отдельно для реагентов и для проб ДНК).
54. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
55. Одноразовые нарукавники.
56. Емкость для сброса наконечников.
57. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше, которое располагается на сайте www.amplisens.ru.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- мокрота,
- ПВБ (БАЛ),
- моча,
- плевральная жидкость,
- асцитическая жидкость,
- спинномозговая жидкость (ликвор),
- фекалии,
- жидкое или плотное содержимое некротического характера из различных органов и тканей (гной, отделяемое из раны или свища, некротические или казеозные массы, содержимое

- свища, туберкулемы, каверны, детрит и др.),
- тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках,
 - культуры микроорганизмов,
 - смывы с объектов окружающей среды.

Мокрота, ПВБ (БАЛ), моча, плевральная жидкость, асцитическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), фекалии, жидкое или плотное содержимое некротического характера из различных органов и тканей, культуры микроорганизмов, выделенные при посеве биологического материала человека на жидкие или плотные питательные среды, адаптированные для роста микобактерий, собираются, транспортируются и хранятся согласно Приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ» как для проведения комплексного микробиологического исследования, включая ПЦР, осуществляемого в специализированных медицинских организациях по профилю «фтизиатрия», так и для ПЦР-исследования, проводимого в лабораториях другого профиля.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал отбирается, транспортируется и хранится для проведения молекулярно-биологических исследований согласно Приказу МЗ РФ №179н от 24.03.2016 г. «О правилах проведения патолого-анатомических исследований».

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать кислый формалин для фиксации тканевого материала.

Из парафинового блока лаборантом-гистологом с помощью одноразового скальпеля или скарификатора извлекается фрагмент ткани размером 2-3 мм³ (без учета объема парафина), намеченный для исследования врачом-патологоанатомом на готовом гистологическом препарате на стекле, и переносится в одноразовую завинчивающуюся полипропиленовую пробирку объемом 2 мл с винтовой горловиной с крышкой, снабженной уплотняющей кольцевой прокладкой и петлей, необходимой для прикрепления крышки.

Для контроля кросс-контаминации на этапе гистологической проводки рекомендуется дополнительно исследовать фрагмент парафина без ткани из того же парафинового блока.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо повторно использовать скальпели или скарификаторы при работе с парафиновыми блоками – это может привести к перекрестной контаминации исследуемым биологическим материалом и, как следствие, получению ложноположительных результатов.

Допускается транспортирование и хранение фрагментов парафиновых блоков до проведения предобработки при температуре от 18 до 25 °С – длительно, не допуская их плавления.

Смывы с объектов окружающей среды

Для контроля контаминации ДНК *MTVc* рекомендуется проводить взятие смывов с бронхоскопов, подготовленных для проведения процедуры бронхоскопии. С этой целью одним миллилитром стерильного физиологического раствора промывают канал и шланг аппарата. Полученный смыв переносят в пробирку объемом 1,5-2,0 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 15 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя 100 мкл образца. Для экстракции ДНК используют 100 мкл надосадочной жидкости с осадком.

Для анализа смывов с объектов окружающей среды возможны два варианта – взятие смывов стерильным физиологическим раствором с последующей экстракцией ДНК или взятие смывов с использованием ТЕ-буфера и проведение непосредственно ПЦР без экстракции ДНК. При выборе варианта анализа необходимо руководствоваться степенью чистоты поверхностей.

ВНИМАНИЕ! Вариант анализа смывов без экстракции ДНК допускается при контроле чистоты рабочих мест в лаборатории или для контроля качества проведенной дезинфекции, в остальных случаях нужно использовать вариант с экстракцией ДНК!

При любом варианте анализа предварительно подготавливают одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5-2,0 мл, в которые вносят по 300 мкл стерильного физиологического раствора или ТЕ-буфера, соответственно. Одноразовые тампоны-зонды смачивают в физиологическом

растворе или ТЕ-буфере и затем берут смывы с поверхности площадью 5-10 см².

Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку, верхнюю часть зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Для анализа используют 100/200 мкл образца при проведении ПЦР-исследования с экстракцией ДНК.

При проведении ПЦР-исследования без экстракции ДНК используют 10 мкл образца (при проведении амплификации с использованием формы FRT-96F) и 25 мкл образца (при проведении амплификации с использованием форм FRT-96L и FRT-96L-t).

Допускается транспортирование и хранение смывов с объектов окружающей среды до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 2 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 недели;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается двукратное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

ВНИМАНИЕ! Запрещено переливать потенциально инфицированный материал через край контейнера (пробирки).

В медицинской организации по профилю «фтизиатрия» для образцов мокроты, ПVB (БАЛ), мочи, плевральной жидкости, асцитической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), фекалий, жидкого или плотного содержимого некротического характера из различных органов и тканей проводится унифицированная предварительная подготовка для микробиологических исследований согласно Приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ».

Предобработанные осадки образцов с надосадочной жидкостью делят на аликвоты в объемах, требуемых для проведения микроскопического, культурального и молекулярно-

биологического исследований. При взятии аликвоты для молекулярно-биологического исследования следует предусмотреть необходимость повторного анализа, для этого берут не менее чем тройной объем образца.

Для экстракции ДНК в пробирки объемом 1,5-2,0 мл отбирают:

- 100 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп») / 200 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб») из ресуспендированных образцов мокроты, мочи и содержимого некротического характера из различных органов и тканей;
- 1 мл из ресуспендированных образцов ПВБ (БАЛ) и спинномозговой жидкости (ликвора);
- 0,5 мл из ресуспендированных образцов плевральной и асцитической жидкостей, фекалий.

Образцы объемом 0,5 и 1 мл центрифугируют при 10 тыс g (например, 12 тыс. об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 15 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя 100 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп») / 200 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб») образца, который используют для экстракции ДНК.

Культуры микроорганизмов, выделенные при посеве биологического материала человека на **плотную** питательную среду (колонии), снимают с поверхности плотной питательной среды одноразовой бактериологической петлей, ресуспендируют в 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида (физиологический раствор). Визуально, используя стандарт мутности, или с помощью денситометра, определяют концентрацию микроорганизмов. Для экстракции ДНК берут 5 мкл суспензии, добавляя 95 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп») / 195 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб») физиологического раствора для получения конечной концентрации не более 5×10^6 м.т./мл. При исследовании культуры, выделенной при посеве биологического материала человека на **жидкую** питательную среду, отбирают аликвоту объемом 1 мл и центрифугируют 10 мин с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например,

13,4 тыс об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф»), затем удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя 100 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп») / 200 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб») образца, который используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение подготовленных культур до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 недели;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках

Отобранные образцы тканевого материала необходимо депарафинизировать с помощью реагентов, предназначенных для этой цели, например, ортоксилола (о-ксилола) химически чистого, или аналогичного, а затем освободить от ксилола серией отмывок с понижающейся концентрацией растворов этанола (аналогично стандартной гистологической проводке).

Порядок депарафинизации:

1. Пробирки с фрагментами парафинового блока прогреть в термостате при температуре 75 °С в течение 15 мин.
2. Процентрифугировать содержимое пробирок при 12 тыс. g или более в течение 30 с на микроцентрифуге.
3. Добавить в пробирки по 1 мл ксилола. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10 с.
4. Оставить пробирки при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) в течение 10 мин, периодически встряхивая на вортексе (не менее 2 раз) или термошейкере для микропробирок.
5. Процентрифугировать содержимое пробирок при 12 тыс. g или более в течение 2 мин на микроцентрифуге.
6. Осторожно, не захватывая фрагменты ткани, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

ВНИМАНИЕ! Фрагмент ткани, находящийся на дне пробирок, прозрачный и трудноразличимый. Необходимо следить, чтобы не удалить его при отборе супернатанта.

7. Повторить п. 3-6.
8. Добавить в пробирки 1 мл 96 % этанола. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10 с.
9. Процентрифугировать содержимое пробирок при 12 тыс. g или более в течение 2 мин на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая фрагменты ткани, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Повторить все шаги п. 8-10.
12. Добавить в пробирки 1 мл 90 % этанола. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10 с.
13. Процентрифугировать содержимое пробирок при 12 тыс. g или более в течение 2 мин на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая фрагменты ткани, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Добавить в пробирки 1 мл 70 % этанола. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10 с.
16. Процентрифугировать содержимое пробирок при 12 тыс. g или более в течение 2 мин на микроцентрифуге.
17. Осторожно, не захватывая фрагменты ткани, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
18. Высушить содержимое, оставив пробирки с открытыми крышками в штативе в течение **10 мин**. Образец готов для проведения этапа экстракции НК.

Для экстракции взять образец обработанной ткани.

В случае использования коммерческих растворов для депарафинизации, действовать согласно инструкции к данному реактиву.

Допускается хранение предобработанных образцов тканей после депарафинизации до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °C – не более 1 недели;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – длительно.

Допускается двукратное замораживание-оттаивание материала.

Нативный биологический материал

В медицинской организации, не работающей по профилю «фтизиатрия», но проводящей исследования на туберкулез согласно Приказу МЗ РФ № 951 от 29.12.2014 г., исследуют нативный биологический материал.

Образцы плевральной жидкости, смывы с объектов окружающей среды не требуют предварительной подготовки.

Образцы мокроты, ПVB (БАЛ), мочи, спинномозговой жидкости (ликвора) требуют предварительной подготовки.

Образцы ПVB (БАЛ), спинномозговой жидкости (ликвора)

Образцы аккуратно перемешивают в исходной емкости с помощью пастеровской пипетки или одноразовым наконечником с фильтром. Отбирают 1 мл образца в пробирку объемом 1,5-2,0 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс. g (например, 12 тыс. об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 15 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя 100 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп») / 200 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб») образца, который используют для экстракции ДНК.

Образцы мокроты

Мокрота подлежит обработке с целью снижения вязкости по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп») / 200 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»)) используют для экстракции ДНК.

Образцы мочи

Образцы аккуратно перемешивают в исходной емкости с помощью пастеровской пипетки или одноразовым наконечником с фильтром. Отбирают 5-10 мл образца в завинчивающуюся пробирку объемом 15 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс g в течение 15 мин. В случае отсутствия в лаборатории высокоскоростной центрифуги применить центрифугирование в режиме 3 тыс g в течение 15 мин.

Аккуратно удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя или пастеровской пипетки, оставляя 100 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов

«РИБО-преп») / 200 мкл (при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб») образца, который используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение вышеперечисленного предобработанного жидкостного биоматериала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

Допускается двукратное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Ограничения по использованию проб

Может наблюдаться ингибирование ПЦР при исследовании:

- образцов мочи со значительными отклонениями от нормы показателей общего клинического анализа мочи: $pH \leq 5.0$, увеличение концентрации глюкозы, обнаружение уробилиногена, аскорбиновой кислоты, нитритов, оксалатов, фосфатов, слизи, воспалительного процесса с увеличением лейкоцитов $\geq 5-10$.
- образцов тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках, для фиксации которых использовался кислый формалин.

Дифференциация *MTB*с может быть невозможна из-за низкой микобактериальной нагрузки в исследуемом образце.

Потенциально интерферирующие вещества

Для контроля эффективности экстракции ДНК из образцов биоматериала и смывов с объектов окружающей среды (в случае выполнения этого этапа), а также реакции амплификации, в наборе реагентов предусмотрено использование экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании ПЦР наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут

присутствовать в биологических материалах, используемых для выявления представителей группы *MTBc*.

Экзогенные вещества

Были протестированы образцы мокроты, ПВБ (БАЛ), мочи, асцитической жидкости, содержимого некротического характера, плевральной жидкости, фекалий и спинномозговой жидкости (ликвора), искусственно инфицированные смесью штаммов *M. tuberculosis* H37Ra и *M. bovis* BCG в концентрациях 1×10^4 ГЭ(м.т.)/мл и 1×10^3 ГЭ(м.т.)/мл, без добавления и с добавлением потенциальных экзогенных интерферентов – противотуберкулезных препаратов – в концентрациях, сопоставимых с C_{max} , в которых данные препараты могут присутствовать в тканях и биологических жидкостях организма человека (см. табл. 7).

Для проверки эффективности ПЦР-исследования тканевого материала в парафиновых блоках был проведен сравнительный эксперимент для оценки влияния кислого и забуференного формалина, используемого на этапе фиксации образцов тканевого биоматериала в процессе пробоподготовки.

Эндогенные вещества

Были протестированы образцы мокроты, ПВБ (БАЛ), мочи, асцитической жидкости, содержимого некротического характера, плевральной жидкости, фекалий и спинномозговой жидкости (ликвора), искусственно инфицированные штаммом *M. bovis* BCG в концентрации 5×10^5 ГЭ(м.т.)/мл, без добавления и с добавлением цельной крови в соотношении 1:1 (см. табл. 7).

Для оценки возможного влияния на ПЦР-исследование компонентов мочи, встречающихся при различных патологических процессах, были протестированы образцы, в которых по результатам общего анализа наблюдались значительные отклонения от нормы (см. табл. 7). В качестве сравнения использовались образцы мочи без патологических изменений.

Таблица 7

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции	
				«РИБО-преп»	«МАГНО-сорб»
Мокрота, ПVB (БАЛ), моча, асцитическая жидкость, содержимое некротического характера, плевральная жидкость, фекалии, спинномозговая жидкость (ликвор)	Экзогенные вещества	Рифампицин	9-17,5 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
		Изониазид	3-7 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
		Этамбутол	2-5 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
		Пиразинамид	39 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
		Офлоксацин	5,2 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
		Канамицин	22 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
		ПАСК	75 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
		Циклосерин	25-30 мкг/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках	Экзогенные вещества	Формалин кислый	—	Обнаружено	Обнаружено
		Формалин забуференный	—	Не обнаружено	Не обнаружено
Моча	Эндогенные вещества	pH≤5.0	—	Обнаружено	Обнаружено
		pH≥7.5	—	Обнаружено	Обнаружено
		Белок	≥ 1 г/л	Не обнаружено	Не обнаружено
		Глюкоза	≥ 5 ммоль/л	Не обнаружено	Обнаружено
		Аскорбиновая кислота	Положительно	Не обнаружено	Не обнаружено
		Билирубин	Умеренно	Не обнаружено	Обнаружено
		Уробилиноген	Повышен	Обнаружено	Обнаружено
		Лейкоциты	≥ 5-10	Не обнаружено	Не обнаружено
		Слизь*	Скучно	Обнаружено	Обнаружено
		Нитриты	Положительно	Не обнаружено	Не обнаружено
		Трипель-фосфаты	Значительно повышено	Не обнаружено	Не обнаружено
		Оксалаты	Значительно	Обнаружено	Обнаружено
		Фосфаты	Значительно	Не обнаружено	Обнаружено
		Ураты	Значительно	Обнаружено	Не обнаружено
Мокрота, ПVB (БАЛ), моча, асцитическая жидкость, содержимое некротического характера, плевральная жидкость, фекалии, спинномозговая жидкость (ликвор)	Эндогенные вещества	Кровь	Соотношение образец: кровь 1:1	Не обнаружено	Не обнаружено

* При исследовании нативных образцов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной

детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,

- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракция ДНК проводится, если в образцах биологического материала обнаружена ДНК *MTB* с помощью набора реагентов Xpert® MTB/RIF (Cepheid, США).

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «РИБО-преп» или «МАГНО-сорб». Порядок работы приведен в инструкциях к комплектам для экстракции.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО-FL – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объемы исследуемых образцов указаны в табл. 8:

Таблица 8

Исследуемые образцы (см. раздел «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК»)	«РИБО-преп»	«МАГНО-сорб»
Биологический материал, не требующий центрифугирования; культуры микроорганизмов, выделенные при посеве биологического материала человека на плотную питательную среду; смывы с объектов окружающей среды	100 мкл	200 мкл
Биологический материал, требующий центрифугирования; культуры микроорганизмов, выделенные при посеве биологического материала человека на жидкую питательную среду; смывы с бронхоскопов	Осадок с надосадочной жидкостью до 100 мл	Осадок с надосадочной жидкостью до 200 мл
Тканевой материал после депарафинизации	Образец обработанной ткани	Образец обработанной ткани

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл С–** при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» и **200 мкл С–** при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

Объем элюции при использовании комплектов реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» указан в табл. 9.

Таблица 9

Форма	Для всех образцов, кроме образцов тканевого материала из парафиновых блоков	Для образцов тканевого материала в парафиновых блоках
FRT-96F	100 мкл	50 мкл
FRT-96L и FRT-96L-t	250 мкл	125 мкл

ВНИМАНИЕ! При экстракции ДНК из исследуемых образцов для элюции используется буфер, входящий в состав комплектов реагентов «РИБО-преп» / «МАГНО-сорб», а также Elution-buffer-A, входящий в состав форм FRT-96L / FRT-96L-t.

ВНИМАНИЕ! Пробы ДНК следует хранить в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп» или «МАГНО-сорб».

ФОРМА FRT-96F**СОСТАВ**

Таблица 10

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Mix-MTBc-diff	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
Buffer-H	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
PCR C+ (MTBc-diff)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
C–	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	3 пробирки
BKO-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft версия 1, дата выпуска 23.05.2022 – на электронном носителе или на официальном сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыши к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок 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.

Перед проведением амплификации рекомендуется отобрать **пробы ДНК**, содержащие ДНК *MTBc* в достаточной концентрации (критерии отбора образцов см. во вкладыше к набору реагентов). В случае низкой микобактериальной нагрузки рекомендуется провести ПЦР-исследование проб ДНК в двух и более повторях. В случае очень низкой нагрузки получение результата при проведении дифференциации *MTBc* не гарантировано.

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл Mix-MTBc-diff** и **5 мкл Buffer-H**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

2. Разморозить пробирки с **Mix-MTBc-diff**, **Buffer-H** и **PCR C+ (MTBc-diff)**. Перемешать содержимое пробирок с **Mix-MTBc-diff** и **Buffer-H**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь, смешав необходимое количество **Mix-MTBc-diff** и **Buffer-H**. Перемешать и осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество индивидуальных или стрипованных пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, в которых ранее была обнаружена ДНК **MTBc**. В случае хранения проб ДНК, их необходимо встряхнуть на вортексе, а затем центрифугировать при 10 тыс g в течение 1 мин.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания магнитной силики в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл PCR C+ (MTBc-diff)**.
- б) **отрицательный контроль ПЦР (K-)** – в одну или две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл C-**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – в

пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОК**.

ВНИМАНИЕ! Постановка отрицательного контроля экстракции (ОК) обязательна в случае проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции ДНК.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок или стрипов на вортексе, используя в последнем случае специальные насадки.

ВНИМАНИЕ! При работе с приборами Rotor-Gene 3000/6000/Q лунка №1 ротора обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой. Если в один ротор загружаются пробирки с образцами, анализируемыми с помощью разных наборов реагентов АмплиСенс/AmpliSens, предназначенных для исследования возбудителей микобактериальных инфекций, то в лунку №1 установить пробирки с реагентами набора AmpliSens® MTBc-diff.

2. Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft, согласно руководству оператора;

Примечание – Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше.

- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной в табл. 11, согласно инструкции по его применению.

Таблица 11

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ типов

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа (см. табл. 11) может применяться для всего комплекса наборов реагентов АмплиСенс/AmpliSens, предназначенных для исследования возбудителей микобактериальных инфекций, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft. Порядок работы с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft описан в руководстве оператора.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по четырем каналам:

Таблица 12

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК <i>M.tuberculosis</i>	ДНК <i>M.bovis</i> / ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК ВКО-FL

⁶ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH).

⁷ Например, CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»)), «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции, имеющей экспоненциальный подъем, с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t). При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft значения C_t определяются автоматически.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 13

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
отсутствует или более граничного	отсутствует или более граничного	отсутствует или более граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.bovis</i> и <i>M.bovis</i> BCG НЕ обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	ДНК <i>M.tuberculosis</i> обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или более граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>M.bovis</i> обнаружена
определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>M.bovis</i> BCG* обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный**

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

*Если результат «ДНК *M.bovis* BCG обнаружена» получен, когда значение C_t определено меньше граничного одновременно по каналам для флуорофоров JOE и ROX, нельзя исключить возможность присутствия в образце смеси ДНК *M.bovis* BCG и ДНК *M.bovis*. Однако, в клинической практике такие случаи не зафиксированы.

В случае получения **невалидного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

При исследовании проб ДНК с низкой микобактериальной нагрузкой в двух или более повторях необходимо руководствоваться следующими принципами:

- если хотя бы в одном повторе определен вид/штамм ДНК *MTBc*, то результат по данному исследуемому образцу выдается как «ДНК соответствующего вида/штамма обнаружена»;
- если во всех повторях образца ДНК *MTBc* не обнаружена, или хотя бы в одном из повторов ДНК *MTBc* не обнаружена, а в остальных повторях получен невалидный результат, то по исследуемому образцу выдается результат «ДНК *M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.bovis* BCG не обнаружена»;
- если во всех повторях образца ДНК получен невалидный результат, то необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 14 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 14

Результаты для контролей ПЦР-исследования

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР- исследо- вания	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля экстракции (OK):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX определено значение порогового цикла (Ct).

Вероятная причина – кросс-контаминация образцов или реагентов исследуемыми аналитами или загрязнение лаборатории или реагентов продуктами амплификации. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации, после чего повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

- б) по каналу для флуорофора Cy5 значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что экстракция ДНК проведена некачественно. Требуется повторная экстракция ДНК с последующим ПЦР-исследованием образцов, в которых не обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов.
2. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 3. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятная причина – кросс-контаминация реагентов исследуемым аналитом при работе с образцами или загрязнение лаборатории продуктами амплификации. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА FRT-96L и ФОРМА FRT-96L-t

СОСТАВ

Таблица 15

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество	
			Форма FRT-96L	Форма FRT-96L-t
Mix-MTBc-diff- Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок, стрипованных по 8 шт. объемом 0,2 мл	96 пробирок, объемом 0,2 мл
PCR C+ (MTBc- diff)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка	1 пробирка
C-	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	3 пробирки	3 пробирки
BKO-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка	1 пробирка
Elution-buffer-A	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон	1 флакон

К форме FRT-96L дополнительно прилагаются оптически-прозрачные крышки для стрипованных пробирок в количестве не менее 12 штук.

ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft версия 1, дата выпуска 23.05.2022 – на электронном носителе или на официальном сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыши к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Перед проведением амплификации рекомендуется отобрать пробы ДНК, содержащие ДНК *MTBc* в достаточной концентрации (критерии отбора образцов см. во вкладыше к набору реагентов). В случае низкой микобактериальной нагрузки рекомендуется провести ПЦР-исследование проб ДНК в двух и более повторях. В случае очень низкой нагрузки получение результата при проведении дифференциации *MTBc* не

гарантировано.

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Перемешать содержимое пробирок с контрольными образцами **PCR C+ (MTBc-diff)** и **C–**, осадить капли на вортексе.
2. Отобрать необходимое количество индивидуальных или стрипованных пробирок с готовой лиофилизированной реакционной смесью **Mix-MTBc-diff-Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 5).

ВНИМАНИЕ! Перед снятием пленки со стрипованных пробирок рекомендуется провести центрифугирование, используя вортекс со специальными насадками. Удаление пленки проводить плавно, без резких движений.

3. В пробирки (лунки стрипованных пробирок) внести:
 - по 25 мкл проб ДНК при объеме элюции 250 мкл;
 - по 10 мкл проб ДНК и 15 мкл **Elution-buffer-A** при объеме элюции 100 мкл.
4. В случае хранения проб ДНК, их необходимо встряхнуть на вортексе, а затем центрифугировать при 10 тыс g в течение 1 мин.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания магнитной силики в реакционную смесь.

5. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл PCR C+ (MTBc-diff)**.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в одну или две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл C–**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести:
 - по **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОК**, при объеме элюции 250 мкл;
 - по **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОК**, и **15 мкл Elution-buffer-A**, при объеме элюции 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Постановка отрицательного контроля экстракции (ОК) обязательна в случае проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Для форм FRT-96L и FRT-96L-t содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха, от которых можно избавиться центрифугированием на вортексе, используя для стрипованных пробирок специальные насадки. В случае если форма FRT-96L-t будет использоваться для амплификации в приборе роторного типа, то центрифугирование на вортексе можно не проводить.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок или стрипов на вортексе, используя в последнем случае специальные насадки.

ВНИМАНИЕ! При работе с приборами Rotor-Gene 3000/6000/Q лунка №1 ротора обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой. Если в один ротор загружаются пробирки с образцами, анализируемыми с помощью разных наборов реагентов АмплиСенс/AmpliSens, предназначенных для исследования возбудителей микобактериальных инфекций, то в лунку №1 установить пробирки с реагентами набора AmpliSens® MTBc-diff.

2. Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft, согласно руководству оператора;

Примечание – Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше.

- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной в табл. 16, согласно инструкции по его применению.

Таблица 16

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁸ и планшетного⁹ типов

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество 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	
	72	15 с	—	

ВНИМАНИЕ! Данная программа (см. табл. 16) может применяться для всего комплекса наборов реагентов АмплиСенс/AmpliSens, предназначенных для исследования возбудителей микобактериальных инфекций, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft. Порядок работы с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft описан в руководстве оператора.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по четырем каналам:

Таблица 17

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК <i>M.tuberculosis</i>	ДНК <i>M.bovis</i> / ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК ВКО-FL

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции, имеющей

⁸ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁹ Например, CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»)), «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

экспоненциальный подъем, с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t). При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft значения C_t определяются автоматически.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 18

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
отсутствует или более граничного	отсутствует или более граничного	отсутствует или более граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.bovis</i> и <i>M.bovis</i> BCG НЕ обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	ДНК <i>M.tuberculosis</i> обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или более граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>M.bovis</i> обнаружена
определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>M.bovis</i> BCG* обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный**

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

*Если результат «ДНК *M.bovis* BCG обнаружена» получен, когда значение C_t определено меньше граничного одновременно по каналам для флуорофоров JOE и ROX, нельзя исключить возможность присутствия в образце смеси ДНК *M.bovis* BCG и ДНК *M.bovis*. Однако, в клинической практике такие случаи не зафиксированы.

В случае получения **невалидного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

При исследовании проб ДНК с низкой микобактериальной нагрузкой в двух или более повторях необходимо руководствоваться следующими принципами:

- если хотя бы в одном повторе определен вид/штамм ДНК *MTBc*, то результат по данному исследуемому образцу выдается как «ДНК соответствующего вида/штамма обнаружена»;
- если во всех повторах образца ДНК *MTBc* не обнаружена, или хотя бы в одном из повторов ДНК *MTBc* не обнаружена, а в остальных получен невалидный результат, то по исследуемому образцу выдается результат «ДНК *M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.bovis* BCG не обнаружена»;
- если во всех повторах образца ДНК получен невалидный результат, то необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 19 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 19

Результаты для контролей ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
		FAM	JOE	ROX	Суб
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):

- а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятная причина – кросс-контаминация образцов или реагентов исследуемыми анализитами или загрязнение лаборатории или реагентов продуктами амплификации. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника

контаминации, после чего повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

- б) по каналу для флуорофора Cy5 значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что экстракция ДНК проведена некачественно. Требуется повторная экстракция ДНК с последующим ПЦР-исследованием образцов, в которых не обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов.
2. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 19) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятная причина – кросс-контаминация реагентов исследуемым анализом при работе с образцами или загрязнение лаборатории продуктами амплификации. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение.

Форма FRT-96F. Хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Не допускается замораживание / оттаивание PCR C+ (MTBc-diff) более 12 раз. Mix-MTBc-diff хранить в защищенном от света месте.

Форма FRT-96L. Хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Mix-MTBc-diff-Lyo в стрипованных пробирках после вскрытия вакуумной упаковки хранить не более трех месяцев в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Форма FRT-96L-t. Хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Mix-MTBc-diff-Lyo в индивидуальных пробирках после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Уменьшение визуализируемого объема лиофилизированных реагентов при их хранении после вскрытия вакуумной упаковки не влияет на функциональные характеристики.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, либо по e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции AmpliSens® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно
для проведения n тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по
применению



Дата изменения



Предел температуры



Изготовитель



Не допускать воздействия
солнечного света



Беречь от влаги



Дата изготовления

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 45
Серия 1147 лист 06

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 15.11.2022 г.)



« 31 » 08 2023 г.

М.П.

А.О.Лисицына

[Handwritten signature]



Краткое руководство

набор реагентов AmpliSens® MTBc-diff

Форма FRT-96F: **REF** H-4381-1

Форма FRT-96L: **REF** H-4382-14

Форма FRT-96L-t: **REF** H-4383-14



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru



ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Экстракция ДНК проводится, если в образцах биологического материала обнаружена ДНК *MTBc* с помощью набора реагентов Xpert® MTB/RIF (Cepheid, США). Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «РИБО-преп» или «МАГНО-сорб».

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Биологический материал, не требующий центрифугирования; культуры микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде; смывы с объектов окружающей среды	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
Биологический материал, требующий центрифугирования; культуры микроорганизмов, выросших на жидкой питательной среде; смывы с бронхоскопов	Осадок с надосадочной жидкостью до 100 мл	
Тканевой материал после депарафинизации	Образец обработанной ткани	
С–	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция (используется буфер, входящий в состав комплекта реагентов «РИБО-преп», а также Elution-buffer-A, входящий в состав форм FRT-96L / FRT-96L-t)		
Все образцы, кроме образцов тканевого материала из парафиновых блоков	100 мкл (для формы FRT-96F)	в каждую пробирку
	250 мкл (для форм FRT-96L, FRT-96L-t)	
Образцы тканевого материала в парафиновых блоках	50 мкл (для формы FRT-96F)	
	125 мкл (для форм FRT-96L, FRT-96L-t)	

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Биологический материал, не требующий центрифугирования; культуры микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде; смывы с объектов окружающей среды	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
Биологический материал, требующий центрифугирования; культуры микроорганизмов, выросших на жидкой питательной среде; смывы с бронхоскопов	Осадок с надосадочной жидкостью до 200 мл	
Тканевой материал после депарафинизации	Образец обработанной ткани	
C–	200 мкл	в пробирку для ОК

Элюция (используется буфер, входящий в состав комплекта реагентов «МАГНО-сорб», а также Elution-buffer-A, входящий в состав форм FRT-96L / FRT-96L-t)

Все образцы, кроме образцов тканевого материала из парафиновых блоков	100 мкл (для формы FRT-96F)	в каждую пробирку
	250 мкл (для форм FRT-96L, FRT-96L-t)	
Образцы тканевого материала в парафиновых блоках	50 мкл (для формы FRT-96F)	
	125 мкл (для форм FRT-96L, FRT-96L-t)	

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ФОРМЫ FRT-96F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 отрицательный контроль экстракции (ОК), 1 отрицательный (K–) и 1 положительный (K+) контроли ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Постановка отрицательного контроля экстракции (ОК) обязательна в случае проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции ДНК.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующегося для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирки с Mix-MTBC-diff, Buffer-H и PCR C+ (MTBC-diff).
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
Mix-MTBC-diff	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
Buffer-H	5*(N+K+1)	

- Отобрать необходимое количество индивидуальных или стрипованных пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл		
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку	
Внести по 10 мкл		
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов (критерии отбора образцов см. во вкладыше к набору реагентов), ОК	в пробирки для исследуемых образцов, ОК	<i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания магнитной силики в реакционную смесь!</i>
PCR C+ (MTBc-diff)	в пробирку для K+	
C—	в пробирку для K—	

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ФОРМ FRT-96L, FRT-96L-t

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (25 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 отрицательный контроль экстракции (ОК), 1 отрицательный (K–) и 1 положительный (K+) контроли ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Постановка отрицательного контроля экстракции (ОК) обязательна в случае проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции ДНК.

- Отобрать необходимое количество индивидуальных или стрипованных пробирок с готовой лиофилизированной реакционной смесью Mix-MTBC-diff-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл		
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов, ОК (при объеме элюции 250 мкл)	в пробирки для исследуемых образцов, ОК	<i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания магнитной силики в реакционную смесь!</i>
15 мкл Elution-buffer-A и 10 мкл проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов, ОК (при объеме элюции 100 мкл)		
PCR C+ (MTBC-diff)	в пробирку для K+	
C–	в пробирку для K–	

ВНИМАНИЕ! Критерии отбора образцов см. во вкладыше к набору реагентов

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок или стрипов на вортексе, используя в последнем случае специальные насадки.

ВНИМАНИЕ! При работе с приборами Rotor-Gene 3000/6000/Q лунка №1 ротора обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой. Если в один ротор загружаются пробирки с образцами, анализируемыми с помощью разных наборов реагентов АмплиСенс/AmpliSens, предназначенных для исследования возбудителей микобактериальных инфекций, то в лунку №1 установить пробирки с реагентами набора AmpliSens® MTBc-diff.

- Запустить программу амплификации:

- а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше;
- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество 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	
	72	15 с	—	

ВНИМАНИЕ! Данная программа может применяться для всего комплекса наборов реагентов АмплиСенс/AmpliSens, предназначенных для исследования возбудителей микобактериальных инфекций, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводить вручную с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® MTBc-diff Soft.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5
Мишень для амплификации	ДНК <i>M.tuberculosis</i>	ДНК <i>M.bovis</i> / ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК <i>M.bovis</i> BCG	ДНК ВКО-FL

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (C_t), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов вручную.

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
gva лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)



« 31 » 08 2023 г. А.О.Лисицына
м.п.