

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор центра постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

Т.А. Шипулин
«29» _____ 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для обнаружения и количественного
определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса
методом полимеразной цепной реакции
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиТест® МБТ»



ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
119121, Российская Федерация,
г. Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	4
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ	5
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА	7
СОСТАВ	8
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	10
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала	11
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	14
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	16
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	19
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕ-МОГО МАТЕРИАЛА	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	25
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	26
А. Подготовка проб для амплификации	26
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	28
В. Анализ и интерпретация результатов	29
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	35
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	37
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	38
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	39
Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ТБ»	39
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	41
Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхоальвеолярный лаваж
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент – количество ДНК-мишени, соответствующее одному геному микобактерии туберкулёза
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
K1 МБТ, K1L МБТ	- ДНК-калибратор МБТ в высокой концентрации
K2 МБТ, K2L МБТ	- ДНК-калибратор МБТ в средней концентрации
K3 МБТ, K3L МБТ	- ДНК-калибратор МБТ в низкой концентрации
К–	- отрицательный контроль ПЦР, не содержащий ДНК МБТ и ДНК ВКО
КОЕ	- колониеобразующие единицы
МБТ	- микобактерии туберкулезного комплекса, <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
МУ	- методические указания
НК	- нуклеиновая кислота
НТМБ	- нетуберкулезные микобактерии
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции и амплификации, содержащий анализируемые фрагменты ДНК МБТ
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
ПО	- программное обеспечение
ПО «FRT Manager»	- программное обеспечение для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
РФ	- Российская Федерация
СанПиН	- санитарно-эпидемиологические правила и нормы
ТБ	- туберкулёз
УДГ, UDG	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
ddPCR	- капельная цифровая ПЦР (droplet digital PCR)
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
PBS	- фосфатно-солевой буфер (Phosphate Buffered Saline)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» (далее – набор реагентов «АмплиТест® МБТ») предназначен для качественного и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса – *Mycobacterium tuberculosis* complex (включает *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*) в образцах биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), биоптата (операционного материала), мочи) и бактериальных культурах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – для диагностики *in vitro*, а именно для выявления и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса – возбудителя туберкулеза.

Популяционные, демографические аспекты применения – набор реагентов предназначен для использования при обследовании больных туберкулезом и подозрительных на туберкулез лиц вне зависимости от их половой и возрастной категории, расовой принадлежности.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется в комплексе с другими методами исследования при обследовании больных туберкулезом и подозрительных на туберкулез лиц с целью быстрого выявления возбудителя туберкулеза и своевременного назначения противотуберкулезной терапии.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

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.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции тотальной ДНК из анализируемого образца (биологического материала человека, бактериальной культуры) совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО) и последующем проведении амплификации участков ДНК МБТ и ДНК ВКО¹ с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации за счет измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью

¹ ВКО добавляется в анализируемый образец на этапе экстракции из него нуклеиновых кислот.

амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

На этапе ПЦР в одной пробирке одновременно проводятся четыре реакции: амплификация специфических для *M. tuberculosis* complex многокопийных мишеней IS6110 и IS1081 (качественное обнаружение ДНК МБТ), однокопийной специфической мишени *mpb64* (количественное определение ДНК МБТ) и ДНК ВКО. Результаты амплификации анализируемых фрагментов генов и ДНК ВКО регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)
Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)	ДНК МБТ (участки генов IS6110 и IS1081)	ДНК МБТ (участок гена <i>mpb64</i>)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последовательность)

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения термолabile фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ, UDG) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащих дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолabilен и инактивируется при нагревании выше 50 °С, поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов выпускается в трех формах комплектации.

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L.

Форма 3 включает комплекты реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L.

Все формы комплектации набора реагентов предназначены для выполнения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК и проведение амплификации с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Составной частью формы 1 является «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, который содержит все реагенты в жидком виде и предназначен для использования всех типов рекомендованных амплификаторов.

Составной частью форм 2 и 3 является «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L, который содержит реакционную смесь в лиофилизированном виде и предназначен для приборов только планшетного типа.

Набор реагентов в форме 1 рассчитан на анализ 100 образцов, включая контроли; в формах 2 и 3 – на анализ 96 образцов, включая контроли.

Комплектность:

- Набор реагентов «АмплиТест® МБТ»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

СОСТАВ

«РИБО-преп ТБ» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала человека и бактериальных культур – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ²	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	2 флакона
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон

К комплекту реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав форм 1 и 2.

«Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала человека и бактериальных культур – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий буфер Комбо	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ²	50	1 флакон
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка

² При хранении при температуре от 2 до 8°C возможно образование осадка в виде кристаллов.

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	1	2 пробирки
Раствор для отмывки Комбо-1	Прозрачная бесцветная жидкость	70	1 флакон
Раствор для отмывки Комбо-2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон

К комплекту реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 3.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*) и ДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL МБТ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-М	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
TaqF полимеразы (UDG)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
Калибратор К1 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Калибратор К2 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Калибратор К3 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав формы 1.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*) и ДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь-FL МБТ-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	-	2 стрипа из 8 пробирок x 6
Калибратор K1L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
Калибратор K2L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
Калибратор K3L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм 2 и 3.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – Аналитическая чувствительность и диапазон измерения набора реагентов «АмплиТест® МБТ»

Вид исследуемого материала	Формат анализа	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл	Диапазон измерения, ГЭ/мл
Мокрота, БАЛ, биоптат, моча, бактериальная культура	Качественный анализ (канал для флуорофора FAM (Green))	1×10^2	-
	Количественный анализ (канал для флуорофора JOE (HEX, VIC, Yellow))	5×10^2	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^8$

Данные предел обнаружения и диапазон измерения достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании штаммов следующих микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 КОЕ/мл: *Mycobacterium tuberculosis* complex – *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra № 700404 и *Mycobacterium bovis* Vallee № 700203 (из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); нетуберкулёзных микобактерий (НТМБ) – *Mycobacterium avium* № 700758, *Mycobacterium kansasii* № 700700, *Mycobacterium fortuitum* № 700711 (из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); клинических штаммов НТМБ – *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. abscessus*, *M. malmoense*; других бактерий, не относящихся к роду *Mycobacterium* – *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33862, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 700324, *Haemophilus influenza* ATCC® 33930, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734 (из коллекции American Type Culture Collection® (ATCC®), США), а также препарата геномной ДНК человека № D7011 («Sigma-Aldrich», США).

Для штаммов *M. tuberculosis* H37Ra и *M. bovis* Vallee получен результат «Обнаружена ДНК *M. tuberculosis* complex» и рассчитана концентрация для них. Во всех остальных случаях получен результат «Не обнаружена ДНК *M. tuberculosis* complex», т.е. неспецифических положительных результатов выявлено не было.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Интерферирующие вещества могут как находиться в образце биологического материала, так и попасть в него на этапе пробоподготовки. Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и реакции амплификации в наборе реа-

гентов предусмотрена одновременная амплификация фрагментов ДНК МБТ и внутреннего контрольного образца (ВКО). ВКО добавляется в каждый анализируемый образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы, концентрация, объем, условия/срок хранения и транспортирования которых не соответствуют требованиям, указанным в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции выбраны эндогенные (муцин, гемоглобин, билирубин, триглицериды, креатинин, мочеви́на, мочева́я кислота) и экзогенные (лидокаин, дексаметазон, тобрамицин, гепарин) вещества, которые могут присутствовать в исследуемом образце биологического материала (мокрота, БАЛ, биоптаты (операционный материал), моча). Для изучения влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ) на полученные результаты испытываемым набором реагентов протестированы модельные образцы в присутствии и в отсутствие указанных выше эндогенных и экзогенных ПИВ. Модельные образцы представляли собой образцы мокроты, БАЛ, биоптата (операционный материал), мочи, не содержавшие ДНК МБТ, контаминированные разведениями штамма *M. tuberculosis* H37Ra до конечных концентраций 1×10^3 , 1×10^5 и 5×10^8 ГЭ/мл, с добавлением эндогенных и экзогенных ПИВ (испытываемые образцы) и без добавления данных веществ (контрольные образцы). Вычисляли разницу полученных средних значений порогового цикла C_t ($\Delta C_{t_{cp}}$) по каналу для флуорофора FAM и разницу полученных средних значений концентраций (по каналу для флуорофора JOE/HEX), выраженных в десятичном логарифме, между контрольными и испытываемыми образцами. При значении $\Delta C_{t_{cp}}$ менее 1,5 циклов и разнице концентраций (Δlg) менее 10% делали вывод об отсутствии влияния потенциально интерфери-

рующих веществ на соответственно качественный и количественный результат ПЦР. Результаты оценки представлены в табл. 3.

Таблица 3 — Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ

Материал	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Концентрация в образце	Наличие интерферирующего эффекта
Мокрота, БАЛ	Эндогенные вещества	Муцин	2 мг/дл	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Лидокаин	51,2 ммоль/л	Не обнаружено
		Дексаметазон	1,53 ммоль/л	Не обнаружено
Биоптаты	Эндогенные вещества	Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
		Билирубин	20 мг/дл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Гепарин	3000 Ед/л	Не обнаружено
Моча	Эндогенные вещества	Мочевина	4,8 г/дл	Не обнаружено
		Креатинин	5 мг/дл	Не обнаружено
		Мочевая кислота	9 мг/дл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Тобрамицин	51,4 ммоль/л	Не обнаружено
		Лидокаин	51,2 ммоль/л	Не обнаружено

Повторяемость, воспроизводимость и правильность

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования трех положительных и одного отрицательного образца каждого вида биологического материала, указанного в назначении. Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 10 повторях, для оценки воспроизводимости – в 30 повторях.

Определение повторяемости проводилось в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же амплификатора.

Определение воспроизводимости проводилось в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах.

Положительные образцы были отобраны в трёх концентрациях внутри диапазона измерения: высокой, низкой и средней.

По результатам тестирования подтверждена воспроизводимость и повторяемость результатов испытаний набора реагентов «АмплиТест® МБТ»:

- в качественном формате коэффициент вариации CV значений Ct CVp составил не более 5 %, CVv составил не более 15 %;
- в количественном формате коэффициент вариации CV значений Lg составил CVp не более 7 %, CVv не более 15 %.

Правильность работы набора реагентов была определена при тестировании разведения штамма *M. tuberculosis* H37Ra в физиологическом растворе (0,9% NaCl) в концентрации $1,61 \times 10^5$ ГЭ/мл, измеренной с помощью капельной цифровой ПЦР.

Величина систематической погрешности (В) составила не более 10 %.

Прослеживаемость значений калибраторов МБТ

Измерение значений калибраторов K1, K2 и K3 МБТ и K1L, K2L и K3L МБТ проводится относительно рабочих калибраторов производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-инженерных конструкций с использованием капельной цифровой ПЦР (ddPCR). Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов составляет не более 5 % (с уровнем доверительной вероятности 95 %).

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики (чувствительность и специфичность) набора реагентов с доверительной вероятностью 95 % определены на основании результатов клинических испытаний относительно набора сравнения – набора реагентов «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия; РУ № ФСР 2010/07635).

Диагностические характеристики набора представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 — Результат тестирования набора реагентов «АмплиТест® МБТ» и набора сравнения «Амплитуб-РВ»

Вид исследуемого материала	Результаты применения набора реагентов	Результаты применения набора сравнения	
		Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)
Мокрота	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	58	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	57
БАЛ	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	60	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	49
Биоптат (операционный материал)	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	97	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	48
Моча	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	51	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	55
Бактериальная культура	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	50	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	50

Таблица 5 — Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® МБТ»

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 %)
Мокрота	93,84-100 %	93,73-100 %
БАЛ	94,04-100 %	92,75-100 %
Биоптат	96,27-100 %	92,60-100 %
Моча	93,02-100 %	93,51-100 %
Бактериальная культура	92,89-100 %	92,89-100 %

³ Диагностическая чувствительность относительно использованного набора сравнения.

⁴ Диагностическая специфичность относительно использованного набора сравнения.

Определение корреляции между количественными результатами

На основании результатов исследования образцов биологического материала построены графики корреляции количественных результатов для десятичного логарифма концентраций, определена величина достоверности аппроксимации R^2 . Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6 — Корреляция количественных результатов, полученных при использовании набора реагентов «АмплиТест® МБТ» и набора сравнения «Амплитуб-РВ»

Вид материала	Величина R^2 для набора реагентов «АмплиТест® МБТ»		
	Форма 1	Форма 2	Форма 3
Мокрота	91,77	92,41	92,45
Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)	91,36	92,38	90,95
Биоптат (операционный материал)	91,33	91,29	90,17
Моча	91,05	91,12	90,75
Бактериальная культура	95,74	95,60	95,70

Величина достоверности аппроксимации R^2 составила выше 90 % при тестировании каждого вида материала, что говорит о наличии прямой корреляции между количественными результатами, полученными разными методами.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил 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 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от плюс 20 до плюс 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, включая 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, 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

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

может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтрами. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность набора»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только

в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортирования, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

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

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

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-100 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия).
2. Одноразовые полипропиленовые пробирки с коническим дном объемом 15 и 50 мл.
3. Одноразовая пипетка Пастера.

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Реагенты для деkontаминации и гомогенизации образцов биологического материала человека методом NALC-NaOH, включающие стерильные растворы гидроксида натрия (NaOH), цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), фосфатного буфера pH 6,8 и N-ацетил-L-цистеин (NALC).

2. Раствор натрия хлорида 0,9 % (стерильный физиологический раствор).
3. Одноразовая пипетка Пастера.
4. Штативы для пробирок объемом 15 и 50 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
5. Центрифуга для пробирок объемом 15 и 50 мл.
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
7. Автоматический дозатор переменного объема до 1000 мкл (например, Biohit, Финляндия).
8. Гомогенизатор (например, Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай) (для биоптатов).
9. Стерильные стеклянные бусы (для бактериальных культур и биоптатов).
10. Стандарт мутности McFarland № 0,5, 1 или 2 (для бактериальных культур).
11. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
12. Отдельный халат, респиратор 3-го класса защиты FFP3 (например, «НЕВА®-306» без клапана выдоха, Россия), шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. При использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» применяется автоматическая станция для экстракции НК (например, процессор магнитных частиц KingFisher Flex 96 («Thermo Fisher Scientific», США), зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:
 - возможность реализации последовательности этапов экстракции в соответствии с данной Инструкцией;

- наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнитного сорбента;
 - наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С;
 - наличие системы перемешивания жидкостей шейкированием или пипетированием.
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
 4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
 5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
 6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1», Россия).
 7. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Biohit, Финляндия).
 8. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл с защелкой (например, «Ахуген», США).
 9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
 10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
 11. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
 12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 13. Отдельный халат, респиратор 3-го класса защиты FFP3 (например, «НЕВА®-306» без клапана выдоха, Россия),

шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

14. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
6. Автоматические дозаторы переменного объема до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Biohit, Финляндия).
7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»,

имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd. («Лайф Текнолоджис Холдингс Птс. Лтд»), Сингапур).

8. Программное обеспечение для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870).
9. Холодильник от плюс 2 до плюс 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования при использовании набора реагентов «АмплиТест® МБТ» являются образцы биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи), бактериальные культуры.

Взятие материала

БАЛ, мокроту, мочу (среднюю порцию), биоптаты (операционный материал) собирают в стерильные одноразовые градуированные плотно закручивающиеся емкости из полипропилена объемом 20-100 мл с широким горлом.

Биоптат (операционный материал) гомогенизируют с помощью гомогенизатора или стеклянных бус.

Бактериальные культуры, выросшие:

1) на плотной питательной среде: переносят колонии в стеклянные пробирки, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl);

2) в жидкой питательной среде: используют оригинальную

пробирку.

Допускается хранение образцов материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – 3 суток (кроме мочи, которую можно хранить не более 6 ч, а в дальнейшем замораживать);

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года.

Допускается транспортирование образцов материала при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 3 суток в термоконтейнерах, содержащих холодоэлементы.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Нативные образцы биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи) подвергнуть предварительной обработке с помощью NALC-NaOH с целью их деконтаминации и гомогенизации в соответствии с Приказом Минздрава России от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации (с изменениями на 5 июня 2017 года)» с получением осадков («единых проб»).

Полученные деконтаминированные осадки («единые пробы») пригодны для исследований как микробиологическими, так и молекулярно-генетическими методами.

До проведения этапа экстракции нуклеиновых кислот отобрать 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца биологического материала с помощью NALC-NaOH, центрифугировать его 15 мин при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g), надосадочную жидкость удалить пипеткой с одноразовым наконечником с фильтром так, чтобы остался осадок в небольшом количестве жидкости – общий объем 100 мкл. Ресуспендировать осадок в остаточном объеме жидкости и проводить экстракцию ДНК при использовании форм 1 и 2 набора реагентов. При выделении ДНК с использованием автоматической станции, до этапа экстракции прогреть ресуспендированный осадок в микропробирке с защелкой при 95 °С в течение 20 мин для инактивации МБТ и, как следствие, безопасной

работы в автоматической станции, а затем проводить экстракцию ДНК.

Образцы бактериальных культур не подвергать предварительной обработке с помощью NALC-NaOH.

В случае с бактериальными культурами, выросшими на плотной питательной среде, ресуспендировать их колонии в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl) или фосфатно-солевом буфере (PBS), используя стандарт мутности McFarland № 0,5; 1 или 2.

В случае с бактериальными культурами, выросшими в жидкой питательной среде, отобрать аликвоту 1 мл и центрифугировать 10 мин при 1 тыс g, затем удалить надосадочную жидкость.

Отобрать 100 мкл культуры микобактерий для этапа экстракции. При выделении ДНК с использованием автоматической станции, до этапа экстракции прогреть ресуспендированный осадок в микропробирке с защелкой при 95 °С в течение 20 мин для инактивации МБТ и, как следствие, безопасной работы в автоматической станции, а затем проводить экстракцию ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из всех типов биологического материала человека (мокрота, БАЛ, биоптат, моча) и бактериальных культур используется комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 для ручного выделения или «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 для автоматического выделения.

Подробная информация по их использованию представлена в Приложениях 1 и 2 к данной инструкции.

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.

А. Подготовка проб для амплификации

Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F (форма 1)

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

- 1. Рассчитать количество каждого реагента, требуемое для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-FL МБТ, 5 мкл ПЦР-буфера-М и 0,5 мкл TaqF полимеразы (UDG). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.**

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

ВНИМАНИЕ! TaqF полимеразу (UDG) необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционной смеси и убирать в морозильную камеру сразу же после ее добавления в реакционную смесь.

- 2. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL МБТ, ПЦР-буфером-М, TaqF полимеразой (UDG), осадить капли кратковременным центрифугированием.**
- 3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Внести необходимое количество ПЦР-смеси-FL МБТ, ПЦР-буфера-М и TaqF полимеразы (UDG), перемешать и осадить капли кратковременным центрифугированием.**
- 4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.**
- 5. В каждую пробирку внести по 15 мкл реакционной смеси.**

Неиспользованные остатки реакционной смеси утилизировать.

6. В пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) положительный контроль экстракции и ПЦР (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ПКО ДНК МБТ;
 - б) отрицательный контроль ПЦР (К–) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К–;
 - в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО
 - г) ДНК-калибратор К1 МБТ (К1) – в две пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл калибратора К1 МБТ;
 - д) ДНК-калибратор К2 МБТ (К2) – в две пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл калибратора К2 МБТ;
 - е) ДНК-калибратор К3 МБТ (К3) – в две пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл калибратора К3 МБТ.

Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-96 L (формы 2 и 3)

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 23 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной Смесью-FL МБТ-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В отобранные пробирки с готовой лиофилизированной реакционной смесью внести по 23 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, полученных экстракцией с помощью комплектов реагентов для выделения нуклеиновых кислот методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

3. Поставить контрольные реакции:
- ж) положительный контроль экстракции ДНК и ПЦР (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести 23 мкл пробы, экстрагированной из ПКО ДНК МБТ;
 - з) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 23 мкл К-;
 - и) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 23 мкл пробы, экстрагированной из ОКО
 - к) ДНК-калибратор К1 МБТ (К1) – в две пробирки с реакционной смесью внести по 23 мкл калибратора К1L МБТ;
 - л) ДНК-калибратор К2 МБТ (К2) – в две пробирки с реакционной смесью внести по 23 мкл калибратора К2L МБТ;
 - м) ДНК-калибратор К3 МБТ (К3) – в две пробирки с реакционной смесью внести по 23 мкл калибратора К3L МБТ;

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием до полного растворения лиофилизированной гранулы, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. При использовании программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (далее – ПО «FRT Manager»)(ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870) постановка ПЦР-РВ осуществляется согласно руководству пользователя к указанному ПО и методическим рекомендациям по проведению амплификации и анализу результатов при помощи ПО «FRT Manager».
- В случае запуска постановки с помощью ПО амплификатора необходимо запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и

детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7 и вкладыш, прилагаемый к данному набору реагентов).

Таблица 7 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ 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 (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange)	
	72	15 с		

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки прибора планшетного типа (тестирования небольшого количества образцов) рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала с помощью ПО «FRT Manager» или ПО амплификатора.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

При использовании для запуска постановки ПО «FRT Manager» анализ полученных данных и интерпретация результатов проводятся автоматически. В случае использования запуска посредством ПО амплификатора анализ и ин-

⁶ Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁷ CFX96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК-Технология), QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.).

терпретацию результатов осуществляют вручную. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем различным каналам флуоресцентной детекции в соответствии с табл. 1 настоящей инструкции. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (указан во вкладыше к набору реагентов), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблиц 8 и 9.

Сначала анализируют результаты, полученные для контрольных образцов. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 11 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 8 — Контроль достоверности этапов экстракции ДНК и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		
		FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)
ПК	Экстракция ДНК и ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного*	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК и ПЦР	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К2	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К3	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

*Полученное значение концентрации по каналу для флуорофора JOE (HEX, VIC, Yellow) отличается не более чем на $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше.

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

Затем анализируют результаты, полученные для исследуемых образцов, в соответствии с таблицами 9 и 10.

Для получения количественного результата необходимо ввести в ПО амплификатора значение концентрации каждого из трех калибраторов только по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow), указанное во вкладыше к набору реагентов, и выбрать единицы измерения «копии/мл». На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1, K2 и K3 по каналу для флуорофора JOE (HEX, VIC, Yellow) (детекция однокопийной мишени *mpb64*) происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет концентрации ДНК *M.tuberculosis complex* в анализируемом образце в единицах измерения «копий/мл», что в случае однокопийной мишени эквивалентно единицам измерения «ГЭ/мл» и «клеток/мл».

Для определения количества ДНК МБТ в реакцию амплификации (копий/реакц) необходимо произвести расчет по следующей формуле:

$$\text{Количество ДНК МБТ} \left(\frac{\text{копий}}{\text{реакц}} \right) = \frac{\text{Полученное значение концентрации} \left(\frac{\text{копий}}{\text{мл}} \right)}{1000} \times 10 \text{ (для формы 1)}$$

$$\text{Количество ДНК МБТ} \left(\frac{\text{копий}}{\text{реакц}} \right) = \frac{\text{Полученное значение концентрации} \left(\frac{\text{копий}}{\text{мл}} \right)}{1000} \times 23 \text{ (для форм 2 и 3)}$$

Для определения количества ДНК МБТ в выделенной пробе (копий) необходимо произвести расчет по следующей формуле (с учетом объема элюции ДНК):

$$\text{Количество ДНК МБТ (копий)} = \frac{\text{Полученное значение концентрации} \left(\frac{\text{копий}}{\text{мл}} \right)}{1000} \times 100 \text{ (для формы 1)}$$

$$\text{Количество ДНК МБТ (копий)} = \frac{\text{Полученное значение концентрации} \left(\frac{\text{копий}}{\text{мл}} \right)}{1000} \times 200 \text{ (для форм 2 и 3)}$$

Калибровочная прямая должна соответствовать следующим требованиям:

1. Коэффициент корреляции R^2 не менее 0,98;
2. Эффективность ПЦР лежит в диапазоне 0,9-1,1.

Несоблюдение получения правильных результатов для контрольных образцов и требований к калибровочной прямой может привести к недостоверным результатам ПЦР-исследования анализируемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 9 — Принципы интерпретации результатов при проведении качественного анализа

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			Результат
FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	
Определено	Определено	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>M. tuberculosis complex</i>
Определено	Отсутствует	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>M. tuberculosis complex</i>
Отсутствует	Отсутствует	Определено меньше граничного	НЕ обнаружена ДНК <i>M. tuberculosis complex</i>
Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
Отсутствует	Определено	Не учитывается	Сомнительный*

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

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

Таблица 10 — Принципы интерпретации результатов при проведении количественного анализа

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			Рассчитанное значение концентрации (по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow))	Результат
FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)		
Определено	Определено	Определено меньше граничного и Ct(образца) – Ct(OK) < 3*	Внутри диапазона измерения набора реагентов $1 \times 10^3 - 5 \times 10^8$ ГЭ/мл	Определена концентрация ДНК <i>M. tuberculosis complex</i> в ГЭ/мл
			Меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов 1×10^3 ГЭ/мл	Определена концентрация ДНК <i>M. tuberculosis complex</i> менее 1×10^3 ГЭ/мл
			Выше верхнего предела диапазона измерения	Определена концентрация ДНК <i>M. tuberculosis complex</i> более 5×10^8 ГЭ/мл

			набора реагентов 5x10 ⁸ ГЭ/мл	
Определено	Отсутствует	Определено меньше граничного и Ct(образца) – Ct(ОК) < 3*	Отсутствует	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex обнаружена. Количественная оценка невозможна**
Отсутствует	Отсутствует	Определено меньше граничного	Отсутствует	НЕ обнаружена ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует	Невалидный***
Отсутствует	Определено	Не учитывается	Не учитывается	Сомнительный***

* Если для анализируемого образца значение Ct по каналу ROX отсутствует или Ct(образца) – Ct(ОК) < 3, то это свидетельствует об ингибировании ПЦР – в таком случае результаты количественного определения ДНК МБТ могут быть недостоверными. При необходимости получения точного количественного результата необходимо развести исследуемый образец реагентом К- (например, в 10 или более раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца.

** Количественная оценка ДНК *M. tuberculosis* complex в образце невозможна в том случае, если концентрация ДНК МБТ менее предела обнаружения мишени *mpb64* (канал детекции JOE (HEX, VIC, Yellow))

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции ДНК и ПЦР (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM (Green) и/или JOE (HEX, VIC, Yellow) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

2. Для калибровочных образцов (K1, K2, K3) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE (HEX, VIC, Yellow) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (K–) определено значение порогового цикла (C_t) по одному или нескольким каналам (FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange)). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов.
4. Для отрицательного контроля экстракции (OK) определено значение порогового цикла (C_t) по одному или нескольким каналам (FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow)). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), 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 ПЦР-исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Набор реагентов формы 1 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

ПЦР-смесь-FL МБТ хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 1 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Форма 2. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Смесь-FL МБТ-Lyo (лиофилизированную) хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Форма 3. Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа

экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С. Смесь-FL МБТ-Луо (лиофилизированную) хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

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 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1, e-mail: promlab@cspfmbs.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 и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Руководитель
производственной лаборатории

Ж.Е.Тарасова

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Код партии



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Дата изменения



Температурный диапа-
зон



Изготовитель



Беречь от влаги



Осторожно! Обратитесь к
инструкции по
применению



Содержимого достаточно
для проведения п-
количества тестов



Использовать до



Обратитесь к инструкции
по применению



Не допускать воздей-
ствия солнечного света



Дата изготовления



Знаки опасности

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ТБ»

Порядок работы:

- 1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.**
- 2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку 10 мкл ВКО-М. Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.**
- 3. В пробирки с раствором для лизиса и ВКО внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку(и)* отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести 100 мкл ПКО ДНК МБТ.**
- 4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.**
- 5. Снова центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки.**
- 6. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, тщательно перемешать на вортексе.**
- 7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g).**
- 8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник на 200 мкл без фильтра.**
- 9. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок: для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.**

10. **Процентрифугировать при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.**
11. **Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник на 200 мкл без фильтра.**
12. **Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.**
13. **Процентрифугировать при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.**
14. **Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник без фильтра на 200 мкл.**
15. **Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).**
16. **Добавить в пробирки по 100 мкл РНК-буфера при использовании формы 1 набора или 200 мкл РНК-буфера при использовании формы 2 набора. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.**
17. **Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.**

Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более.

***При экстракции НК из образцов с высокой концентрацией МБТ рекомендуется каждый такой образец обставлять слева и справа как минимум одним образцом ОК во избежание контаминации соседних образцов.**

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100

А. Порядок работы на автоматической станции с магнитным штативом

ВНИМАНИЕ! К работе с автоматической станцией может быть допущен только персонал, прошедший обучение работе на станции данного вида. Программирование последовательности действий, указанной ниже, осуществляется с использованием инструкции к конкретному виду станции.

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Смешать в отдельной пробирке **ВКО-М**, **буфер GT** и **магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО-М**, **10 мкл буфера GT** и **20 мкл магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.
3. Внести в пробирки для исследуемых и контрольных образцов по **40 мкл** подготовленной смеси **ВКО**, **буфера GT** и **магнитного сорбента**.
4. Добавить в пробирки со смесью **ВКО**, **буфера GT** и **магнитного сорбента** **500 мкл лизирующего буфера Комбо**.
5. Добавить в пробирки со смесью **ВКО**, **буфера GT**, **магнитного сорбента** и **Лизирующего буфера Комбо** по **100 мкл исследуемых образцов**.
6. В пробирку(и)* отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **100 мкл ПКО ДНК МБТ**.
7. Поместить на борт автоматической станции емкости с раствором для отмывки **Комбо-1**, раствором для отмывки **Комбо-2** и **РНК-буфером**.
8. Установить пробирки с исследуемыми и контрольными образцами, полученными в соответствии с пунктами 5 и 6, на борт автоматической станции.
9. Перемешивать содержимое пробирок с исследуемыми и контрольными образцами при **60°C** в течение **5 мин**.

10. Поместить пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в магнитный штатив на 1 мин.
11. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по 700 мкл раствора для отмывки Комбо-1.
12. Перемешивать содержимое пробирок с исследуемыми образцами.
13. Повторить пункт 10.
14. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по 500 мкл раствора для отмывки Комбо-2.
15. Перемешивать содержимое пробирок с исследуемыми образцами.
16. Повторить пункт 10.
17. Высушить магнетизированную силику, оставив открытые пробирки на магнитном штативе в течение 5 минут.
18. Добавить в пробирки по 200 мкл РНК-буфера.
19. Перемешивать содержимое пробирок с исследуемыми образцами при 60°C в течение 5 мин.
20. Перенести раствор в чистые пробирки, не вынимая пробирки с магнитным сорбентом из магнитного штатива.
21. Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

***При экстракции НК из образцов с высокой концентрацией МБТ рекомендуется каждый такой образец обставлять слева и справа как минимум одним образцом ОК во избежание контаминации соседних образцов.**

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°С – год и более.

Б. Порядок работы на автоматической станции с магнитными стержнями

ВНИМАНИЕ! К работе с автоматической станцией может быть допущен только персонал, прошедший обучение работе на станции данного вида. Программирование последовательности

действий, указанной ниже, осуществляется с использованием инструкции к конкретному виду станции.

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Смешать в отдельной пробирке **ВКО-М, буфер GT и магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО-М, 10 мкл буфера GT и 20 мкл магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.
3. Внести в лунки глубоколоночного планшета для исследуемых и контрольных образцов по **40 мкл подготовленной смеси ВКО, буфера GT и магнитного сорбента**.
4. Добавить в лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, буфера GT и магнитного сорбента **500 мкл лизирующего буфера Комбо**.
5. Добавить в лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, буфера GT, магнитного сорбента и Лизирующего буфера Комбо по **100 мкл исследуемых образцов**.
6. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **100 мкл ПКО ДНК МБТ**.
7. Внести в лунки соответствующих глубоколоночных планшетов, размещаемых на автоматической станции, по **700 мкл раствора для отмывки Комбо-1, 500 мкл раствора для отмывки Комбо-2 и по 200 мкл РНК-буфера**.
8. Установить планшет с исследуемыми и контрольными образцами, полученными в соответствии с пунктами 5 и 6, на борт автоматической станции.
9. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми и контрольными образцами при **60°С в течение 5 мин**.
10. Опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **1 мин**.
11. Перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-1.
12. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми образцами.
13. Повторить пункт 10.

14. Перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмытки Комбо-2.
15. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми образцами.
16. Повторить пункт 10.
17. Высушить магнетизированную силику, оставив магнитные стержни с намагниченным сорбентом на открытом воздухе в течение **5 минут**.
18. Поместить магнитные стержни в лунки планшета с элюирующим буфером.
19. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми образцами при **60°C** в течение **5 мин**.
20. Удалить магнитный сорбент из лунок планшета с помощью магнитных стержней.
21. Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °C до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°C – год и более.

ЛИСТ а

Г.А. Шипулин





Краткое руководство

Набор реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно- флуоресцентной детекцией **«АмплиТест® МБТ»** форма 1

REF T-R024-1-FRT

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1
e-mail: promlab@cspfmba.ru

IVD

VER 27.06.23

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.

Набор реагентов может быть использован для исследования биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, биоптата (операционного материала), мочи) и бактериальных культур.

ВНИМАНИЕ! Образцы биологического материала человека пригодны для анализа с помощью данного набора реагентов только после их предварительной обработки с помощью NALC-NaOH (с целью их деконтаминации и гомогенизации). Обработка бактериальных культур с помощью NALC-NaOH не требуется.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ с помощью «РИБО-преп ТБ» вариант 100

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

Для каждой группы экстрагируемых образцов:

1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции добавить:		
ВКО-М	10 мкл	в каждую пробирку (т.е. в пробирки с исследуемыми образцами, а также в пробирки для ОК и ПК)
Исследуемые образцы	100 мкл*	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ПКО ДНК МБТ	100 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
РНК-буфер	100 мкл	в каждую пробирку (с высушенным осадком)

*Для образцов биологического материала человека указан объем осадка, полученного после центрифугирования в течение 15 мин при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца с помощью NALC-NaOH, и удаления надосадочной жидкости.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ПЦР рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК. Допускается хранение проб ДНК не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой амплификации необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ с помощью «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

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

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов три калибратора (K1, K2, K3), положительный контроль экстракции ДНК и ПЦР (ПК), отрицательный контроль ПЦР (К-), отрицательный контроль экстракции (ОК) по одному повтору каждого, кроме калибраторов, которых по два повтора.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL МБТ.
- В отдельной пробирке приготовить одну реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL МБТ	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей (в данном наборе реагентов $K=6$); 1 – запас
ПЦР-буфер-М	$5 \cdot (N+K+1)$	
TaqF полимеразы (UDG)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

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

- Отобрать необходимое количество пробирок (индивидуальных или стрипованных) для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

Внести по 15 мкл

Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
----------------------------------	-------------------

Внести по 10 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки с реакционной смесью для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку с реакционной смесью для отрицательного контроля экстракции (ОК)
Пробы, экстрагированной из ПК О ДНК МБТ	в пробирку с реакционной смесью для положительного контроля экстракции и ПЦР (ПК)
ДНК-калибратора K1 МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
ДНК-калибратора K2 МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
ДНК-калибратора K3 МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
К-	в пробирку с реакционной смесью для отрицательного контроля ПЦР (К-)

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы (для приборов роторного типа и планшетного типа) - в случае использования ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. 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 (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange)	
	72	15 с		

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

В случае использования программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ПО «FRT Manager»: ООО «ИЛС», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) необходимо запустить ПО и следовать к данному ПО и методическим рекомендациям по проведению амплификации

и анализу результатов при помощи ПО «FRT Manager» (программа амплификации уже заложена в ПО при выборе необходимой методики, поэтому вручную ее вводить не надо).

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора в любом направлении: вертикально или горизонтально. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или автоматически при использовании ПО «FRT Manager». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

Канал для флуорофора	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)
Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)	ДНК МБТ (участки генов IS6110 и IS1081)	ДНК МБТ (участок гена <i>mpb64</i>)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последовательность)

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов роторного и планшетного типа и граничные значения C_t , необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Принципы анализа и интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.



Краткое руководство

Набор реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно- флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» форма 2

REF T-R024-2Lyo-FRT

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1
e-mail: promlab@cspfmbaru

IVD

VER 27.06.23

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.

Набор реагентов может быть использован для исследования биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, биоптата (операционного материала), мочи) и бактериальных культур.

ВНИМАНИЕ! Образцы биологического материала человека пригодны для анализа с помощью данного набора реагентов только после их предварительной обработки с помощью NALC-NaOH (с целью их деконтаминации и гомогенизации). Обработка бактериальных культур с помощью NALC-NaOH не требуется.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ с помощью «РИБО-преп ТБ» вариант 100

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

Для каждой группы экстрагируемых образцов:

1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции добавить:		
ВКО-М	10 мкл	в каждую пробирку (т.е. в пробирки с исследуемыми образцами, а также в пробирки для ОК и ПК)
Исследуемые образцы	100 мкл*	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ПКО ДНК МБТ	100 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
РНК-буфер	200 мкл	в каждую пробирку (с высушенным осадком)

*Для образцов биологического материала человека указан объем осадка, полученного после центрифугирования в течение 15 мин при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца с помощью NALC-NaOH, и удаления надосадочной жидкости.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ПЦР рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК. Допускается хранение проб ДНК не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой амплификации необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ с помощью «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (23 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов три калибратора (K1, K2, K3), положительный контроль экстракции ДНК и ПЦР (ПК), отрицательный контроль ПЦР (К-), отрицательный контроль экстракции (ОК) по одному повтору каждого, кроме калибраторов, которых по два повтора.

- Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **Смесью-FL МБТ-Лyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

Внести по 23 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки с реакционной смесью для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку с реакционной смесью для отрицательного контроля экстракции (ОК)
Пробы, экстрагированной из ПКО ДНК МБТ	в пробирку с реакционной смесью для положительного контроля экстракции и ПЦР (ПК)
ДНК-калибратора K1L МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
ДНК-калибратора K2L МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
ДНК-калибратора K3L МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
К-	в пробирку с реакционной смесью для отрицательного контроля ПЦР (К-)

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием до полного растворения лиофилизированной гранулы, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы (для приборов планшетного типа) - в случае использования ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. 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	FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange)	40
	65	30 с		
	72	15 с		

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

В случае использования программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ПО «FRT Manager»; ООО «ИЛС», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) необходимо запустить ПО и следовать указаниям руководства пользователя к данному ПО и методическим рекомендациям по проведению амплификации и анализу результатов при помощи ПО «FRT Manager» (программа амплификации уже заложена в ПО при выборе необходимой методики, поэтому вручную ее вводить не надо).

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора в любом направлении: вертикально или горизонтально. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или автоматически при использовании ПО «FRT Manager». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

Канал для флуорофора	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)
Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)	ДНК МБТ (участки генов IS6110 и IS1081)	ДНК МБТ (участок гена <i>mpb64</i>)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последовательность)

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов роторного и планшетного типа и граничные значения C_t , необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Принципы анализа и интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.



Краткое руководство

Набор реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно- флуоресцентной детекцией **«АмплиТест® МБТ»** форма 3

REF T-R024-3Lyo-FRT

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1
e-mail: promlab@cspfmbaru

IVD

VER 27.06.23

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.

Набор реагентов может быть использован для исследования биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, биоптата (операционного материала), мочи) и бактериальных культур.

ВНИМАНИЕ! Образцы биологического материала человека пригодны для анализа с помощью данного набора реагентов только после их предварительной обработки с помощью NALC-NaOH (с целью их деkontаминации и гомогенизации). Обработка бактериальных культур с помощью NALC-NaOH не требуется.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ с помощью «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100

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

Для каждой группы экстрагируемых образцов:

1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции добавить:		
ВКО-М	10 мкл	в каждую пробирку (т.е. в пробирки с исследуемыми образцами, а также в пробирки для ОК и ПК)
Исследуемые образцы	100 мкл*	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ПКО ДНК МБТ	100 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
РНК-буфер	200 мкл	в каждую пробирку (с высушенным осадком)

*Для образцов биологического материала человека указан объем осадка, полученного после центрифугирования в течение 15 мин при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца с помощью NALC-NaOH, и удаления надосадочной жидкости.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ПЦР рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК. Допускается хранение проб ДНК не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой амплификации необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ с помощью «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (23 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов три калибратора (K1, K2, K3), положительный контроль экстракции ДНК и ПЦР (ПК), отрицательный контроль ПЦР (К-), отрицательный контроль экстракции (ОК) по одному повтору каждого, кроме калибраторов, которых по два повтора.

- Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с готовой лиофилизированной реакционной смесью-FL МБТ-Луо для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

Внести по 23 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки с реакционной смесью для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку с реакционной смесью для отрицательного контроля экстракции (ОК)
Пробы, экстрагированной из ПКО ДНК МБТ	в пробирку с реакционной смесью для положительного контроля экстракции и ПЦР (ПК)
ДНК-калибратора K1L МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
ДНК-калибратора K2L МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
ДНК-калибратора K3L МБТ	в две пробирки с реакционной смесью для построения калибровочной прямой
К-	в пробирку с реакционной смесью для отрицательного контроля ПЦР (К-)

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием до полного растворения лиофилизированной гранулы, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы (для приборов планшетного типа) - в случае использования ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. 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	FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange)	40
	65	30 с		
	72	15 с		

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

В случае использования программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ПО «FRT Manager»; ООО «ИЛС», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) необходимо запустить ПО и следовать указаниям руководства пользователя к данному ПО и методическим рекомендациям по проведению амплификации и анализу результатов при помощи ПО «FRT Manager» (программа амплификации уже заложена в ПО при выборе необходимой методики, поэтому вручную ее вводить не надо).

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора в любом направлении: вертикально или горизонтально. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или автоматически при использовании ПО «FRT Manager». Амплификатор анализирует интенсивность флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

Канал для флуорофора	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)
Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)	ДНК МБТ (участки генов IS6110 и IS1081)	ДНК МБТ (участок гена <i>mpb64</i>)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последовательность)

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов роторного и планшетного типа и граничные значения C_t , необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Принципы анализа и интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено

печатью

9

лист

46

Директор центра постгеномных технологий ФГБУ

«НЦП» ФМБА России

бюджетное учреждение

«Центр стратегического

планирования и

управления

медико-биологическими

рисками

Федерального

медико-биологического

агентства

Г.А. Шипулин



СОГЛАСОВАНО

Директор центра постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСГ» ФМБА России)

«29» _____ 2023 г. Г.А. Шипулин



ПАСПОРТА КАЧЕСТВА МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

набора реагентов для обнаружения и количественного определения
ДНК микобактерий туберкулезного комплекса
методом полимеразной цепной реакции
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиТест® МБТ»

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1, +7(499)246-58-24; факс +7(499)245-03-14; e-mail: promlab@cspfmba.ru; сайт: www.amplitest.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» форма 1

LOT 221114	 2022-11-14
	 2023-11-14

ТУ 21.20.23-024-01897400-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange). Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green) и JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца ПК (положительный контроль экстракции и ПЦР)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow), полученное значение концентрации отличается не более чем на $\pm 0,5$ lg от значения, указанного во вкладыше	соответствует
Положительный результат для образца ПК, разведенного в сто раз (ПК 1:100)	Определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Отрицательный результат для образца К– (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange)	соответствует
Положительный результат для образца К1 (калибратор 1)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К2 (калибратор 2)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К3 (калибратор 3)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Коэффициент эффективности (E) при построении калибровочной прямой	От 0,9 до 1,1	соответствует
Коэффициент корреляции (R^2) при построении калибровочной прямой	Не менее 0,98	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100		
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета*	соответствует
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

REF T-R024-1-FRT

Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F		
ПЦР-смесь-FL МБТ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует
ПЦР-буфер-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
TaqF полимеразы (UDG)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K1 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K2 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K3 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

* При хранении при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Набор реагентов формы 1 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

ПЦР-смесь-FL МБТ хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 1 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи **14.11.22**

Руководитель производственной лаборатории



(Ж.Е. Тарасова)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1, +7(499)246-58-24; факс +7(499)245-03-14; e-mail: promlab@cspfmba.ru; сайт: www.amplitest.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» форма 1

LOT 221115	 2022-11-15
	 2023-11-15

ТУ 21.20.23-024-01897400-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange). Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green) и JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца ПК (положительный контроль экстракции и ПЦР)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow), полученное значение концентрации отличается не более чем на $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше	соответствует
Положительный результат для образца ПК, разведенного в сто раз (ПК 1:100)	Определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange)	соответствует
Положительный результат для образца К1 (калибратор 1)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К2 (калибратор 2)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К3 (калибратор 3)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Коэффициент эффективности (Е) при построении калибровочной прямой	От 0,9 до 1,1	соответствует
Коэффициент корреляции (R^2) при построении калибровочной прямой	Не менее 0,98	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100		
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета*	соответствует
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

REF T-R024-1-FRT

Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F		
ПЦР-смесь-FL МБТ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует
ПЦР-буфер-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
TaqF полимеразы (UDG)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K1 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K2 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K3 МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

* При хранении при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих холодоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Набор реагентов формы 1 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент K- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

ПЦР-смесь-FL МБТ хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 1 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи **15.11.22**

Руководитель производственной лаборатории



(Ж.Е. Тарасова)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1, +7(499)246-58-24; факс +7(499)245-03-14; e-mail: promlab@cspfmba.ru; сайт: www.amplitest.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» форма 2

LOT 221205	2022-12-05
	2023-12-05

ТУ 21.20.23-024-01897400-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange). Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green) и JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца ПК (положительный контроль экстракции и ПЦР)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow), полученное значение концентрации отличается не более чем на $\pm 0,5$ lg от значения, указанного во вкладыше	соответствует
Положительный результат для образца ПК, разведенного в сто раз (ПК 1:100)	Определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange)	соответствует
Положительный результат для образца К1 (калибратор 1)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К2 (калибратор 2)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К3 (калибратор 3)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Коэффициент эффективности (Е) при построении калибровочной прямой	От 0,9 до 1,1	соответствует
Коэффициент корреляции (R^2) при построении калибровочной прямой	Не менее 0,98	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100		
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета*	соответствует
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L		
Смесь-FL МБТ-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	соответствует
Калибратор K1L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K2L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K3L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

* При хранении при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Смесь-FL МБТ-Lyo (лиофилизированную) хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи **05.12.22**

Руководитель производственной лаборатории



(Ж.Е. Тарасова)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1, +7(499)246-58-24; факс +7(499)245-03-14; e-mail: promlab@cspfmba.ru; сайт: www.amplitest.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» форма 2

LOT 221206	 2022-12-06
	 2023-12-06

ТУ 21.20.23-024-01897400-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange). Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green) и JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца ПК (положительный контроль экстракции и ПЦР)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow), полученное значение концентрации отличается не более чем на $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше	соответствует
Положительный результат для образца ПК, разведенного в сто раз (ПК 1:100)	Определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange)	соответствует
Положительный результат для образца К1 (калибратор 1)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К2 (калибратор 2)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К3 (калибратор 3)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Коэффициент эффективности (Е) при построении калибровочной прямой	От 0,9 до 1,1	соответствует
Коэффициент корреляции (R^2) при построении калибровочной прямой	Не менее 0,98	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100		
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета*	соответствует
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L		
Смесь-FL МБТ-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	соответствует
Калибратор K1L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K2L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K3L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

* При хранении при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

2. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Смесь-FL МБТ-Lyo (лиофилизированную) хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи **06.12.22**

Руководитель производственной лаборатории



(Ж.Е. Тарасова)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1, +7(499)246-58-24; факс +7(499)245-03-14; e-mail: promlab@cspfmba.ru; сайт: www.amplitest.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» форма 3

LOT 221205	 2022-12-05
	 2023-12-05

ТУ 21.20.23-024-01897400-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange). Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green) и JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца ПК (положительный контроль экстракции и ПЦР)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow), полученное значение концентрации отличается не более чем на $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше	соответствует
Положительный результат для образца ПК, разведенного в сто раз (ПК 1:100)	Определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Отрицательный результат для образца К– (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange)	соответствует
Положительный результат для образца К1 (калибратор 1)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К2 (калибратор 2)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К3 (калибратор 3)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Коэффициент эффективности (Е) при построении калибровочной прямой	От 0,9 до 1,1	соответствует
Коэффициент корреляции (R^2) при построении калибровочной прямой	Не менее 0,98	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100		
Лизирующий буфер Комбо	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета*	соответствует
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	соответствует
Раствор для отмывки Комбо-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

REF T-R024-3Lyo-FRT

Раствор для отмывки Комбо-2	Прозрачная бесцветная жидкость	
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L		
Смесь-FL МБТ-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	соответствует
Калибратор K1L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K2L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K3L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

* При хранении при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Смесь-FL МБТ-Lyo (лиофилизированную) хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи **05.12.22**

Руководитель производственной лаборатории



(Ж.Е. Тарасова)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1, +7(499)246-58-24; факс +7(499)245-03-14; e-mail: promlab@csfmfa.ru; сайт: www.amplitest.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» форма 3

LOT 221206	 2022-12-06
	 2023-12-06

ТУ 21.20.23-024-01897400-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange). Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green) и JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца ПК (положительный контроль экстракции и ПЦР)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow), полученное значение концентрации отличается не более чем на $\pm 0,5$ lg от значения, указанного во вкладыше	соответствует
Положительный результат для образца ПК, разведенного в сто раз (ПК 1:100)	Определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствуют значения C_t по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange)	соответствует
Положительный результат для образца К1 (калибратор 1)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К2 (калибратор 2)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Положительный результат для образца К3 (калибратор 3)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow) и ROX (Orange). Определена расчетная концентрация по каналу JOE (HEX, VIC, Yellow)	соответствует
Коэффициент эффективности (Е) при построении калибровочной прямой	От 0,9 до 1,1	соответствует
Коэффициент корреляции (R^2) при построении калибровочной прямой	Не менее 0,98	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Комплект реагентов «Магню-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100		
Лизирующий буфер Комбо	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета*	соответствует
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	соответствует
Раствор для отмывки Комбо-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

REF T-R024-3Lyo-FRT

Раствор для отмывки Комбо-2	Прозрачная бесцветная жидкость	
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО ДНК МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L		
Смесь-FL МБТ-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	соответствует
Калибратор K1L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K2L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Калибратор K3L МБТ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

* При хранении при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. Комплект реагентов «Магнo-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ, ВКО-М и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Смесь-FL МБТ-Lyo (лиофилизированную) хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи **06.12.22**

Руководитель производственной лаборатории



(Ж.Е. Тарасова)

Копия верна

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 13 лист об

Директор центра постгеномных технологий ФГБУ
«ЦСП» ФМБА России

Г.А. Шипулин

