



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«03» августа 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для качественного определения статуса полиморфизмов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёзного комплекса к химиотерапевтическим препаратам первой линии (рифампицин, изониазид), методом мультиплексной ПЦР-РВ «MTB-RESIST-I-тест»

ТУ 21.20.23-032-97638376-2020

Версия 4 от 03.08.2022

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Версия 4 от 03.08.2022

Содержание

Список сокращений	4
Введение.....	5
1. Назначение.....	9
2. Принцип метода	10
3. Состав набора реагентов	13
4. Характеристики набора реагентов	16
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест»	25
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	26
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	28
8. Анализируемые образцы	29
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	36
10. Проведение анализа	37
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	40
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора.....	49
13. Утилизация	50
14. Гарантийные обязательства, контакты	51
Приложение А	52
Приложение Б	53

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
МТВ	Mycobacterium tuberculosis (лат.)
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности
КОС	контрольный образец специфичности

Введение

Инфекционные заболевания, вызванные микобактериями туберкулёзного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* и др), являются одной из причин снижения качества жизни, часто приводят к летальному исходу. Важным компонентом выбора адекватной терапии туберкулёза является своевременное выявление лекарственной устойчивостью возбудителя.

Вывод о лекарственной устойчивости при использовании молекулярно-генетических методов основывается на выявлении мутаций в генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к определённым группам препаратов.

Использование молекулярно-генетических методов для определения лекарственной устойчивости является первоначальным этапом обследования пациентов и не исключает необходимость применения традиционных культуральных методов исследования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёзного комплекса. Выявление мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью в ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса с определением чувствительности к изониазиду и рифампицину, является приоритетным компонентом комплекса исследований у пациентов с туберкулёзом^{1,2,3,4}.

Целевые анализы: специфичные участки геномной ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса – фрагменты генов:

rpoB (β-субъединица РНК-полимеразы) – выявляются, но не дифференцируются полиморфизмы кодонов 510–533 (по

¹ Клинические рекомендации. Туберкулез у взрослых. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Год утверждения: 2020.

² Методические рекомендации по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания. Утв. приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 951 от 29 декабря 2014 г.

³ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2014. 56 с.

⁴ WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2019. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 104 p. (ISBN 978-92-4-155052-9)

номенклатуре *Escherichia coli*⁵), при этом тест-система не чувствительна к не имеющим клиническую значимость возможным синонимичным мутациям в кодонах 513 (p.Q513Q, с.1539A>G) и 514 (p.F514F, с.1542C>T); с высокой вероятностью дифференцируются полиморфизмы D516V, D516Y, 526-го кодона, L533R, L533P, S531L; *kaiG* (каталаза-пероксидаза) – дифференцируются полиморфизмы, приводящие к аминокислотным заменам S315T, S315N, S315R, S315I;

inhA (α -субъединица ингибина) – выявляется полиморфизм промоторной области гена *inhA* C-15T, а также выявляются, но не дифференцируются полиморфизмы региона -20 – +6.

Научная обоснованность целевого анализа

В соответствии с клиническими рекомендациями «Туберкулез у взрослых», год утверждения 2020 г. (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации):

«Приоритетным компонентом комплекса исследования у пациентов с туберкулезом рекомендуется определение мутаций ассоциированных с лекарственной устойчивостью в ДНК микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) с определением чувствительности к изониазиду и рифампицину или как минимум к рифампицину. Исследование выполняется двукратно при отрицательном результате первого исследования, а также при положительном результате и одновременном отсутствии клинико-рентгенологических признаков туберкулезного заболевания.

Комментарии: Основное преимущество молекулярно-генетических методов (МГМ) в том, что они являются «быстрыми» и высокочувствительными, позволяющими получить результаты в короткие (1-2 дня) сроки, в отличие от культуральных исследований (10-90 дней), а также имеют высокую чувствительность - 75% (микроскопический метод – 50%). Заключение о наличии МБТ в диагностическом материале делается на основании выявления ДНК МБТ. Положительные результаты молекулярно-генетических методов не определяют статус бактериовыделения, как микроскопические и культуральные методы.

⁵ Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // Lancet. 1993. Vol. 341. № 8846. P. 647–650.

Вывод о лекарственной устойчивости (ЛУ) при использовании МГМ основывается на выявлении мутаций в генах, ассоциированных с ЛУ. Важным достоинством МГМ является быстрое и достоверное выявление у пациентов туберкулеза с МЛУ МБТ, что позволяет разделить потоки пациентов и своевременно назначить IV режим химиотерапии. Использование МГМ для определения ЛУ является первоначальным этапом обследования пациентов и не исключает необходимость применения традиционных культуральных методов исследования лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ.»

Научная обоснованность целевого анализа заключается в ассоциации изучаемых полиморфизмов генов *rpoB*, *katG* и *inhA* с формированием лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёзного комплекса по отношению к химиотерапевтическим препаратам первой линии – рифампицину (*rpoB*), изониазиду (*katG* и *inhA*) и их аналогам.

Выявляемые полиморфизмы гена *rpoB* приходятся на кодоны 510–533, соответствующие региону RRDR⁶ (rifampicin resistance determining region), который определяет резистентность к рифампицину. Всего известно более 30 клинически значимых полиморфизмов (замены нуклеотидов, делеции и инсерции) региона.

Дифференцируемые полиморфизмы гена *katG*: S315T, S315N, S315R, S315I, из которых замена S315T является наиболее частой, ассоциированы с лекарственной устойчивостью штаммов к изониазиду^{7,8,9}.

⁶ Goldstein B.P. Resistance to rifampicin: a review // The Journal of Antibiotics. 2014. Vol. 67. P. 625–630.

⁷ Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Geneva: World Health Organization, 2021. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 107 p. (ISBN 978-92-4-001728-3)

⁸ Unissa A.N., Doss C.G.P., Kumar T., Sukumar S., Lakshmi A.R., Hanna L.E. Analysis of interactions of clinical mutants of catalase-peroxidase (*KatG*) responsible for isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* with derivatives of isoniazid // Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2017. Vol. 11. P. 57–67.

⁹ Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Распространенность мутаций в генах микобактерий туберкулеза, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду и рифампицину, у больных туберкулезом в разных возрастных группах // Туберкулёз и болезни лёгких. 2019. Т. 97, № 4. С. 12–18.

Дифференцируемый полиморфизм в промоторе гена *inhA*: наиболее часто встречающийся С-15Т^{7,8,9}. В детектируемой области -20 – +6 могут находиться редко встречающиеся полиморфизмы (например, А-16G, Т-8А, Т-8С), которые не дифференцируются в ходе анализа, но которые могут давать среднюю лекарственную устойчивость к действию изониазида.

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика, инфекционная диагностика.

Показания и противопоказания к применению: Показания к применению: набор реагентов «MTB-RESIST-I-тест» рекомендуется у пациентов с подтверждённым диагнозом лёгочный и внелёгочный туберкулёз для выбора соответствующей терапии.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: Набор реагентов «MTB-RESIST-I-тест» предназначен для качественного определения статуса молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам первой линии – рифампицину, изониазиду и их аналогам, с помощью технологии молекулярных маяков с детекцией в режиме реального времени в пробе ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса, выделенной из клинического материала (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, промывные воды желудка, плевральная жидкость, кровь, моча, культуры микроорганизмов, секрет простаты, тканевой (биопсийный и операционный) материал, синовиальная жидкость, перикардальная жидкость и спинномозговая жидкость), у пациентов с подтверждённым диагнозом лёгочный и внелёгочный туберкулёз для выбора соответствующей терапии.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для назначения соответствующего режима химиотерапии при лечении туберкулёза.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник, лабораторный технолог.

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная полимеразная цепная реакция в реальном времени с детекцией температур плавления ДНК-зондов (молекулярные маяки).

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса, выделенные из клинического материала: мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, промывные воды желудка, плевральная жидкость, кровь, моча, культуры микроорганизмов, секрет простаты, тканевой (биопсийный и операционный) материал, синовиальная жидкость, перикардальная жидкость и спинномозговая жидкость.

Принцип определения

Качественное выявление молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам рифампицин и изониазид, микобактерий туберкулёзного комплекса методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени с детекцией температур плавления ДНК-зондов (молекулярные маяки) в пробе ДНК, выделенной из клинического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК с дальнейшим плавлением ДНК-зондов;
3. Интерпретация результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков геномной ДНК при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера 5x входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют флуоресцентно-меченые ДНК-зонды (молекулярные маяки), которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени. ДНК-зонды с 5' и 3'-концов снабжены адаптерами (адаптер с 5'-конца комплементарен адаптеру с 3'-конца), а также с одного конца – красителем, с другого – тушителем. При

формировании адаптерами гибридационного комплекса, происходит сближение красителя и тушителя и, соответственно, наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции. Формирование гибридационного комплекса ДНК-зонда и ДНК-мишени приводит к пространственному разобщению красителя и тушителя и, соответственно, к увеличению интенсивности флуоресценции. Температура плавления ДНК-зондов зависит от количества комплементарных нуклеотидов ДНК-зонда и ДНК-мишени. Наивысшее значение температуры плавления T_m регистрируется при наиболее полном соответствии ДНК-зондов ДНК-мишени. Анализ температур плавления ДНК-зондов (гибридационного комплекса ДНК-зонда и ДНК-мишени) позволяет сделать вывод о количестве комплементарных нуклеотидов ДНК-зонда и ДНК-мишени и о соответствии определённого ДНК-зонда ДНК-мишени, в результате чего делается заключение о нахождении молекулярно-генетических полиморфизмов.

Набор содержит реагенты для качественного выявления молекулярно-генетических полиморфизмов генов *groB*, *katG* и *inhA*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам рифампицин и изониазид, а также ВКО (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Смесь олигонуклеотидов	Канал, соответствующий флуорофору				
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red	Cy5.5 / Crimson
A	<i>rpoB</i> : кодоны 529–533	<i>rpoB</i> : кодоны 523–528	<i>rpoB</i> : кодоны 516–522	<i>rpoB</i> : кодоны 510–515	–
B	<i>katG</i> : кодон 315 – норма	<i>katG</i> : p.S315T1	<i>katG</i> : p.S315T2	<i>katG</i> : p.S315N	–
C	<i>inhA</i> : норма региона -20 – +6	<i>inhA</i> : C-15T	<i>katG</i> : p.S315R	<i>katG</i> : p.S315I	BKO

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения ДНК и наличие возможных ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к получению ложноотрицательных результатов.

Ограничения метода

Проведение анализа с использованием клинического материала не содержащего ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса.

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК или проведения реакции мультиплексной ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истёкшим сроком годности или нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

В случае присутствия в анализируемом образце ДНК нескольких штаммов микобактерий туберкулёзного комплекса, несущих разные мутации анализируемых регионов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, возможно получение невалидных результатов.

Время проведения реакции мультиплексной ПЦР составляет от 125 до 165 минут (без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «MTB-RESIST-I-тест» выпускается в одной форме комплектации – «MTB-RESIST-I-тест».

Количество анализируемых проб

Набор реагентов выпускается в одной форме комплектации (табл. 2), рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 29 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 8 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Таблица 2 – Состав набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
3	Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
4	Смесь олигонуклеотидов С	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
5	ПКО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 120 мкл
6	ПКО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 120 мкл
7	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 800 мкл
8	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 300 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными холодоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

Состав набора

ПЦР-буфер 5х готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

Смеси олигонуклеотидов готовы к использованию и содержат праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней – см. таблицу 1.

Прохождение реакции с ВКО оценивается по наличию пика плавления по каналу Cy5.5/Crimson реакционной смеси С в

диапазоне от 60 до 70 °С. Положительное прохождение реакции свидетельствует об эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии в реакции ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции с ВКО и одновременном отсутствии реакций по каналам спецификации FAM/Green, Hex/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red, результат следует считать невалидным, для данного исследуемого образца провести повторное исследование, начиная с выделения ДНК. В случае повторения невалидного результата следует заново произвести забор биоматериала у данного пациента.

Положительный контрольный образец 1 (ПКО-1) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, не содержащие выявляемые полиморфизмы и соответствующие нуклеотидной последовательности *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank: NC_000962.3).

Положительный контрольный образец 2 (ПКО-2) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, содержащие полиморфизмы (относительно нуклеотидной последовательности *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – GenBank: NC_000962.3) в генах:

rpoB: D516V, S522L, H526Y, L533P;

katG: S315T;

inhA: C-15T.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз.

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и представляет собой препарат плазмидной ДНК.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «MTB-RESIST-I-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
1) Внешний вид		
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов С	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-032-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-032-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-032-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
2.1. Положительный результат с ПКО-1	Регистрируются единичные пики в диапазоне от 50 до 80 °С по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, а также Cy5.5/Crimson для реакционной смеси С	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.2. Положительный результат с ПКО-2	Регистрируются единичные пики в диапазоне от 50 до 80 °С по каналам FAM/Green, HEX/Yellow,	Раздел 7, пункт 7.8.2

	ROX/Orange, Cy5/Red, а также Cy5.5/Crimson для реакционной смеси С	
2.3. Отрицательный результат с ОКО	Единичные пики в диапазоне от 50 до 80 °С по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson отсутствуют.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.4. Прохождение реакции в пробирках с КОС	Единичные пики в диапазоне от 50 до 80 °С по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red отсутствуют. Регистрируются пики по каналу Cy5.5/Crimson реакционной смеси С в диапазоне от 60 до 70 °С	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.5. Прохождение реакции в пробирках с КОЧ-1	Регистрируются единичные пики в диапазоне от 50 до 80 °С по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, а также Cy5.5/Crimson для реакционной смеси С	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.6. Прохождение реакции в пробирках с КОЧ-2	Регистрируются единичные пики в диапазоне от 50 до 80 °С по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, а также Cy5.5/Crimson для реакционной смеси С	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.7 Прохождение реакции в образце ОКО+ВКО	Единичные пики в диапазоне от 50 до 80 °С по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red отсутствуют. Регистрируются пики по каналу Cy5.5/Crimson реакционной смеси С в диапазоне от 60 до 70 °С	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.8 Оценка показателя ΔT_m ($T_m(\text{ПКО-1}) - T_m(\text{ПКО-2})$)	Оценка показателя ΔT_m ($T_{m(\text{ПКО-1})} - T_{m(\text{ПКО-2})}$): для реакционной смеси А: $\Delta T_{m(\text{ров})}$ для каналов FAM, HEX, ROX и Cy5 > 2. для реакционной смеси В: $\Delta T_{m(\text{kat3})}$ для каналов FAM и Cy5 > 0; $\Delta T_{m(\text{kat3})}$ для канала HEX < -2; $\Delta T_{m(\text{kat3})}$ для канала ROX < -2; Наименьшее значение $\Delta T_{m(\text{kat3})}$ должно быть для канала HEX.	Раздел 7, пункт 7.8.2

	для реакционной смеси С: $\Delta T_{m(inhA)}$ для канала FAM > 0; $\Delta T_{m(inhA)}$ для канала HEX < 0; $\Delta T_{m(katG)}$ для каналов ROX и Cy5 > 0.	
2.9 Тест на правильность выявления полиморфизмов	Полученный результат качественного определения полиморфизмов генов <i>rpoB</i>, <i>katG</i> и <i>inhA</i> должен соответствовать результату, установленному для стандартного образца предприятия (СОП) секвенированием по Сэнгеру.	Раздел 7, пункт 7.8.2

Примечание: При проведении контрольной ПЦР в качестве КОЧ и КОС используют:

- в качестве стандартных контрольных образцов для определения чувствительности (КОЧ-1, КОЧ-2) используют смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной ДНК микобактерий с концентрацией 5000 копий в 1 мл каждой и фрагмента генома бактериофага с концентрацией $1 \cdot 10^7$ копий/мл в 10 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА);

- контрольный образец специфичности (КОС), представляющий собой смесь раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии Jurkat с концентрацией 1 000 копий на 5 мкл (200 000 копий/мл).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Набор реагентов «MTB-RESIST-I-тест» специфичен по отношению к целевым фрагментам генов *rpoB*, *katG* и *inhA* ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, включая *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*.

Аналитическая специфичность целевых фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA* подтверждалась *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК:

нетуберкулезных микобактерий (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. terrae*), и гетерологичных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,

Haemophilus influenzae, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1 и 2 типов (в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл)

4.2.2 Аналитическая чувствительность

Не менее 5 000 копий геномной ДНК на 1 мл биоматериала, при условии выделения ДНК из 100 мкл образца и элюции объемом 50 мкл.

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости стандартные образцы предприятия были исследованы по 10 повторам:

- **СОП-ПКО-1**, представляющий собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов геномной ДНК микобактерий (фрагментов генов *groB*, *katG* и *inhA*, не содержащие выявляемые полиморфизмы и соответствующие нуклеотидной последовательности *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank: NC_000962.3) - POS_RP_W, POSkat_WT, POSinh_15W) и фрагмента генома бактериофага (pMS2) в 10 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) с концентрацией 1×10^7 копий на 1 мл каждой, производства ООО «ТестГен». **Содержит 100% нормальных копий ДНК** («дикий тип» генов *groB*, *katG* и *inhA* (без мутаций));

- **СОП-ПКО-2**, представляющий собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов геномной ДНК микобактерий, содержащих полиморфизмы D516V, S522L, H526Y, L533P гена *groB*, S315T1 гена *katG*, C-15T гена *inhA* (относительно нуклеотидной последовательности *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – GenBank: NC_000962.3) и фрагмента генома бактериофага (pMS2) в 10 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) с концентрацией 1×10^7 копий на 1 мл каждой, производства ООО «ТестГен». **Содержит 100% мутантных копий ДНК.**

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторях контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%.

4.2.4. Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости, однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости коэффициент вариации не превышал 5%.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было использовано 160 клинических образцов (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, промывные воды желудка, плевральная жидкость, кровь, моча, культуры микроорганизмов, секрет простаты, тканевой (биопсийный и операционный) материал, синовиальная жидкость, перикардальная жидкость и спинномозговая жидкость), от пациентов с подтверждённым диагнозом лёгочный и внелёгочный туберкулёз.

Для оценки перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «MTB-тест» были исследованы также 12 образцов нетуберкулезных микобактерий (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. terrae*) и 37 образцов, не содержащих исследуемые антитела, но с подтверждённым положительным наличием гетерологичных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Human herpesvirus 5*, *Human herpesvirus 1*, *Human herpesvirus 2*.

Выделение ДНК из клинических образцов осуществлялось с помощью, рекомендованных в инструкции по применению исследуемого набора «MTB-RESIST-I-тест», наборов для экстракции

ДНК:

- для выделения ДНК из мокроты, крови, мочи и секрета простаты: Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

- для выделения ДНК из бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, промывных вод желудка, плевральной жидкости, культуры микроорганизмов, тканевого (биопсийного и операционного) материала, синовиальной жидкости, перикардиальной жидкости и спинномозговой жидкости - Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» по ТУ 9398-004-01897593-2008 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.).

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов Набор реагентов для качественного определения статуса полиморфизмов генов groV, katG и inhA, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёзного комплекса к химиотерапевтическим препаратам первой линии (рифампицин, изониазид), методом мультиплексной ПЦР-РВ «MTB-RESIST-I-тест», производства ООО «ТестГен» и набором сравнения «Амплитуб-МЛУ-РВ» ООО «Синтол», Россия.

Для проведения ПЦР-исследования были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

При тестировании всех 160 образцов испытуемым набором реагентов «MTB-RESIST-I-тест» в двух сериях (320 наблюдения) для всех четырех амплификаторов результаты качественного определения статуса полиморфизмов генов groV, katG и inhA совпали с результатами набора сравнения «Амплитуб-МЛУ-РВ» ООО «Синтол», Россия.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик будут рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2307/2331986). Диагностические характеристики испытуемого набора были рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Результаты изучения диагностических характеристик исследуемого медицинского изделия по отношению к каждому исследованному клиническому материалу и анализируемым молекулярно-генетическим полиморфизмам генов *rpoB*, *katG* и *inhA* приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристики клинической эффективности

Вид исследуемого материала	Исследуемый ген	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мокрота	<i>rpoB</i>	24	24	100% (95% ДИ: 85,75%–100%)	100% (95% ДИ: 85,75%–100%)
	<i>katG</i>	12	36	100% (95% ДИ: 73,54%–100%)	100% (95% ДИ: 90,26%–100%)
	<i>inhA</i>	14	34	100% (95% ДИ: 76,84%–100%)	100% (95% ДИ: 89,72%–100%)
Бронхо-альвеолярный лаваж	<i>rpoB</i>	14	14	100% (95% ДИ: 76,84%–100%)	100% (95% ДИ: 76,84%–100%)
	<i>katG</i>	8	20	100% (95% ДИ: 63,06%–100%)	100% (95% ДИ: 83,16%–100%)
	<i>inhA</i>	10	18	100% (95% ДИ: 69,15%–100%)	100% (95% ДИ: 81,47%–100%)
Промывные воды бронхов	<i>rpoB</i>	14	24	100% (95% ДИ: 76,84%–100%)	100% (95% ДИ: 85,75%–100%)
	<i>katG</i>	12	26	100% (95% ДИ: 73,54%–100%)	100% (95% ДИ: 86,77%–100%)
	<i>inhA</i>	14	24	100% (95% ДИ: 76,84%–100%)	100% (95% ДИ: 85,75%–100%)
Промывные воды желудка	<i>rpoB</i>	12	14	100% (95% ДИ: 73,54%–100%)	100% (95% ДИ: 76,84%–100%)
	<i>katG</i>	10	16	100% (95% ДИ: 69,15%–100%)	100% (95% ДИ: 79,41%–100%)

				100%)	100%)
	inhA	6	20	(100% (95% ДИ:54,07 %- 100%)	(100% (95% ДИ:83,16%- 100%)
Плевральная жидкость	rpoB	8	16	(100% (95% ДИ:63,06%- 100%)	100% (95% ДИ:79,41%- 100%)
	katG	10	14	100% (95% ДИ:69,15%- 100%)	(100% (95% ДИ:76,84%- 100%)
	inhA	6	18	(100% (95% ДИ:54,07 %- 100%)	(100% (95% ДИ:81,47%- 100%)
Кровь	rpoB	28	34	(100% (95% ДИ:76,84%- 100%)	100% (95% ДИ:89,72%- 100%)
	katG	22	40	(100% (95% ДИ:84,56%- 100%)	(100% (95% ДИ:91,19%- 100%)
	inhA	22	40	(100% (95% ДИ:84,56%- 100%)	(100% (95% ДИ:91,19%- 100%)
Моча	rpoB	14	16	(100% (95% ДИ:76,84%- 100%)	100% (95% ДИ:79,41%- 100%)
	katG	12	18	100% (95% ДИ:73,54%- 100%)	(100% (95% ДИ:81,47%- 100%)
	inhA	10	20	(100% (95% ДИ:69,15%- 100%)	(100% (95% ДИ:83,16%- 100%)
Культуры микроорга низмов	rpoB	4	8	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%)	(100% (95% ДИ:63,06%- 100%)
	katG	4	8	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%)	(100% (95% ДИ:63,06%- 100%)
	inhA	6	6	(100% (95% ДИ:54,07 %- 100%)	(100% (95% ДИ:54,07 %- 100%)
Секрет простаты	rpoB	4	6	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%)	(100% (95% ДИ:54,07 %- 100%)
	katG	4	6	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%)	(100% (95% ДИ:54,07 %- 100%)
	inhA	4	6	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%)	(100% (95% ДИ:54,07 %- 100%)
Тканевой (биопсий ный и операцион ный) материал	rpoB	8	10	(100% (95% ДИ:63,06%- 100%)	100% (95% ДИ:69,15%- 100%)
	katG	4	14	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%)	(100% (95% ДИ:76,84%- 100%)
	inhA	10	8	100%	(100%

				(95% ДИ:69,15%-100%)	(95% ДИ:63,06%-100%)
Синови- альная жидкость	gpoB	6	4	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)
	katG	2	8	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)
	inhA	2	8	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)
Перикарди- альная жидкость	gpoB	2	4	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)
	katG	2	4	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)
	inhA	4	2	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)
Спинно- мозговая жидкость	gpoB	4	6	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)
	katG	4	6	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)
	inhA	4	6	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест»

В пограничную зону риска вошли опасности:

Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;

Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;

Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирок ПКО-1, ПКО-2 или продуктами ПЦР;

Проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);

Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;

Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для качественного выявления генетических полиморфизмов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к рифампицину и изониазиду микобактерий туберкулёзного комплекса методом мультиплексной ПЦР-РВ «MTB-RESIST-I-тест»» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б, в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н (в редакции приказа Минздрава России от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий»).

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «MTB-RESIST-I-тест», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «MTB-RESIST-I-тест», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации пуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09), приказом от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических 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». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09, требований приказа от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855).

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III–IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

- не использовать набор по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с набором реагентов осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. ПЦР-бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).

2. Микроцентрифуга-вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник с поддерживаемой температурой от 2 до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.

5. Амплификатор¹⁰ с возможностью детекции сигнала флуоресценции по флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson в режиме анализа кривых плавления: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

¹⁰ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Ахуген», США).

2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл;

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (при использовании амплификаторов планшетного типа) или оптически прозрачными стенками (в случае использования амплификаторов роторного типа) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл¹¹, или пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;

4. Халат и одноразовые перчатки без талька.

5. Емкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

7. Набор для выделения ДНК из клинического материала (см. п. 8.2 Инструкции).

8. При проведении анализа с использованием мокроты и синовиальной жидкости: Реагент для предобработки слизистого материала "МУКОЛИЗИН" по ТУ 9398-159-01897593-2011, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (РУ № ФСР 2011/12082 от 13.03.2019)

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса, выделенные из клинического материала: мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, промывные воды желудка, плевральная

¹¹ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым амплификатором.

жидкость, кровь, моча, культуры микроорганизмов, секрет простаты, тканевой (биопсийный и операционный) материал, синовиальная жидкость, перикардальная жидкость и спинномозговая жидкость.

8.1. Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012, с приказом от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855.

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами III группы патогенности.

Забор материала на исследование

Забор материала необходимо производить до начала химиотерапии.

Мокрота. Следует собирать в одноразовые завинчивающиеся ёмкости с широким горлом объёмом не менее 50 мл. Рекомендуемый объём биоматериала – от 3 до 5 мл. В целях повышения информативности практикуется повторное (до трёх раз в течение трёх последовательных дней) исследование мокроты.

Промывные воды бронхов, желудка, бронхоальвеолярный лаваж, спинномозговая жидкость. Собирать в одноразовые плотно завинчивающиеся ёмкости объёмом не менее 5 мл.

Кровь, плевральная жидкость, перикардальная жидкость. Рекомендуется собирать в вакуумные пробирки с консервантом ЭДТА. После забора биоматериала рекомендуется несколько раз перевернуть пробирку для перемешивания консерванта.

Моча (средняя часть утренней порции или вся утренняя порция). Следует собирать в стерильные контейнеры, одноразовые завинчивающиеся ёмкости с широким горлом объёмом не менее 50 мл, после тщательного туалета наружных половых органов. Анализ мочи на микобактерии должен предусматривать обязательное трехкратное исследование.

Секрет простаты. Взятие материала осуществляют в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 секрет простаты забирают после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной железы ее собирают в одноразовую стерильную сухую пластиковую пробирку объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и маркируют.

В случае, если количество клинического материала не достигает объема, необходимого для проведения экстракции ДНК (100 мкл), требуется довести объем с помощью физиологического раствора. При невозможности получить секрет, сразу после массажа простаты, собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл.

Синовиальная жидкость. Собирать в одноразовые плотно закрывающиеся ёмкости.

Тканевой (биопсийный и операционный) материал. Следует помещать в одноразовые вакуумные пробирки с консервантом ЭДТА или одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 0,2 мл стерильного физиологического раствора.

Культуры микроорганизмов. Ресуспендировать колонию в 0,2 мл стерильного физиологического раствора – в случае плотной питательной среды, или использовать непосредственно жидкую среду.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала

Мокрота, тканевой (биопсийный и операционный) материал, культуры микроорганизмов: при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток, при температуре от минус 18 до минус 22 °С – не более 1 недели.

Бронхоальвеолярный лаваж и промывные воды бронхов, секрет простаты, моча, синовиальная, плевральная, перикардиальная, спинномозговая жидкости, промывные воды желудка: при

температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток, при температуре от минус 18 до 22 °С – не более 1 недели.

Кровь: при температуре от 2 до 8 °С – не более 12 часов.

Кровь не замораживать. Допускается двукратное замораживание и оттаивание остального клинического материала.

Предварительная обработка материала

Объём аликвоты для экстракции ДНК – не менее 100 мкл в случае жидкого биоматериала или 10–20 мм³ гомогената твёрдой ткани. Аликвота должна быть помещена в пробирку типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл. Все пробирки с исследуемыми образцами должны быть промаркированы. Рекомендованный объём элюции – 50 мкл.

Мокрота и синовиальная жидкость. Требуется предварительная обработка муколизисом (РУ №ФСР 2011/12082 от 13.03.2019) в соответствии с инструкцией к используемому набору для выделения нуклеиновых кислот.

Промывные воды бронхов, желудка, перикардальная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж, спинномозговая жидкость. Перемешать переворачиванием, после чего отобрать 1 мл образца в пробирку типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл. Пробирку промаркировать. Центрифугировать 10 минут при 10 000 g. Используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой, удалить супернатант, оставив необходимый для экстракции объём образца.

Кровь, плевральная жидкость. Подготовка не требуется.

Моча (средняя часть утренней порции или вся утренняя порция). Взболтать контейнер с мочой, перенести 10 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой, центрифугировать 5 минут при 10 000 g или 20 минут при 3 000 g. Используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой, удалить супернатант. К осадку добавить транспортную среду до конечного объёма 0,2–1,0 мл (в зависимости от необходимого для экстракции объёма). В случае отсутствия видимого осадка после центрифугирования, не следует полностью удалять супернатант, необходимо оставить около 0,2–1,0 мл. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе.

Секрет простаты. В случае, если количество клинического материала не достигает объёма, необходимого для проведения экстракции ДНК (100 мкл), требуется довести объём с помощью

физиологического раствора. При невозможности получить секрет, сразу после массажа простаты, собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл. В этом случае предварительную обработку проводить по предыдущему пункту.

Тканевый (биопсийный и операционный) материал. Требуется предварительная гомогенизация образца объёмом 10–20 мм³ любым доступным способом.

Культуры микроорганизмов. В случае использования микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде, использовать 5–10 мкл суспензии, доведённой стерильным физиологическим раствором до объёма, необходимого для экстракции ДНК. В случае использования микроорганизмов, выросших на жидкой питательной среде, аликвоту объёмом 500–1000 мкл центрифугировать 5 минут при 3 000 g, после чего удалить супернатант и довести объём стерильным физиологическим раствором до объёма, необходимого для экстракции ДНК.

Учёт, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие микобактериальных инфекций, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности, приказом от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855).

Утилизация клинического материала (класс В), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

8.2 Процедура получения пробы ДНК человека, выделенной из клинического материала

Для выделения пробы ДНК из клинического материала рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- при использовании в качестве клинического материала мокроты, крови, мочи и секрета простаты: Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ

21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

– при использовании в качестве клинического материала бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, промывных вод желудка, плевральной жидкости, культуры микроорганизмов, тканевого (биопсийного и операционного) материала, синовиальной жидкости, перикардиальной жидкости и спинномозговой жидкости - Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» по ТУ 9398-004-01897593-2008 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.).

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

К каждому исследуемому образцу перед выделением следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения ДНК в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО. Если инструкцией производителя набора реагентов для выделения ДНК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- при 2 – 8°C – не более суток (24 ч),
- при минус 18 – минус 22°C – не более месяца,
- при минус 80°C – длительно.

ВНИМАНИЕ! Перед анализом необходимо убедиться в наличии в образце ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса с помощью соответствующего набора реагентов.

8.3. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые

могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца биологическим агентом (гемоглобин, гиалуроновая кислота) может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест»:

Тип	Вещество	Активный компонент	Концентрация
Эндогенные	Биологические агенты	гемоглобин	260 мкг/мл
		гиалуроновая кислота	50 мкг/мл
Экзогенные	Противотуберкулезный препарат	изониазид	0,02 мг/мл
	Антибиотик, рифампицин	рифампицин	0,02 мг/мл
	Антибиотик, аминогликозид	стрептомицин	0,2 мг/мл
	Антибиотик, аминогликозид	канамицин	0,2 мг/мл
	Антибиотик, аминогликозид	амикацин	0,2 мг/мл
	Противотуберкулезный препарат	этамбутол	0,02 мг/мл
	Противотуберкулезный препарат	пиразинамид	0,05 мг/мл
	Антибактериальный препарат группы фторхинолонов	офлоксацин	0,04 мг/мл
	Антибактериальный препарат группы фторхинолонов	ципрофлоксацин	0,05 мг/мл
	Противотуберкулезный препарат	протионамид	0,05 мг/мл

	Антибиотик группы производных аминосалициловой кислоты. Противотуберкулезный препарат.	капреомицин	0,2 мг/мл
	Антибиотик. Противотуберкулезный препарат	циклосерин	0,05 мг/мл

На основании результатов исследования данные вещества не оказывают интерферирующего воздействия на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);
- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом;
- проведение анализа возможно только с использованием клинического материала, содержащего ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

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

Перед приготовлением реакций необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём, с применением дезинфицирующих средств,

пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером 5х, смесями олигонуклеотидов А, В и С, ПКО-1, ПКО-2 и ОКО и, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объемом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из расчёта: 3 х (количество исследуемых образцов + 1 ПКО-1 + 1 ПКО-2 + 1 ОКО) (табл. 5).

Таблица 5 – Принцип маркировки пробирок

	Исследуемые образцы			ПКО-1	ПКО-2	ОКО
	1	2	n			
Реакционная смесь А	+	+	+	+	+	+
Реакционная смесь В	+	+	+	+	+	+
Реакционная смесь С	+	+	+	+	+	+

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК с дальнейшим плавлением ДНК-зондов;
3. Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции.

Для приготовления каждой реакционной смеси – А, В и С необходимо:

1. ПЦР-буфер 5х – 5 мкл,
2. Соответствующая смесь олигонуклеотидов – 15 мкл,

3. Образец (исследуемый образец ДНК, ПКО-1, ПКО-2, ОКО) – 5 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл или планшет для ПЦР.

2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь А: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов.

3. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь В: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов.

4. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь С: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов.

5. В соответствующие пробирки для ПЦР внести по 20 мкл приготовленной реакционной смеси А, В и С (табл. 5).

6. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл выделенной ДНК (табл. 5). В пробирки для ПКО-1, ПКО-2 и ОКО препарат ДНК не вносится.

7. Внести в соответствующие 3 пробирки по 5 мкл ПКО-1.

8. Внести в соответствующие 3 пробирки по 5 мкл ПКО-2.

9. Внести в соответствующие 3 пробирки по 5 мкл ОКО, прошедшего этап выделения.

10. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) ПЦР-амплификация ДНК с анализом температур плавления ДНК-зондов в режиме реального времени

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ПЦР, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Тип анализа: ПЦР-амплификация с дальнейшим анализом кривых плавления с детекцией сигнала флуоресценции. Протокол ПЦР указан в таблицах 6–8, в зависимости от используемого амплификатора.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов QuantStudio 5 и аналогичных необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации. Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «Melt Curve Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x3 – m3, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene Q и аналогичных необходимы настройки оптимизации уровня сигнала, где в разделе «Опт. уровня сигнала» при создании протокола плавления выбрать пункт «Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции» для всех каналов, при этом указать нужный диапазон стартового сигнала от 2 до 10 Fl. Функция «Оптимизация уровня сигнала до начала плавл. во всех пробирках» должна быть неактивна.

3. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red для реакционных смесей A и B, и FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson для реакционной смеси C.

5. Запустить протокол амплификации с анализом кривых плавления.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 6 – Протокол ПЦР и анализ температур плавления для амплификаторов, кроме Rotor-Gene Q, DTLite и DTprime

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00	–	–
2	95	00:15	–	50
	64	00:45	–	
3	Плавнение с 35°С до 85°С, инкремент 0,5°С	00:10	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	50

Таблица 7 – Протокол ПЦР и анализ температур плавления для амплификаторов DTLite и DTprime

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00	–	–
2	95	00:15	–	50
	64	00:45	–	
3	Плавнение с 35°С до 85°С, инкремент 1,0°С	00:25	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	50

Таблица 8 – Протокол ПЦР и анализ температур плавления для амплификаторов Rotor-Gene Q и аналогичных

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00	–	–
2	95	00:15	–	50
	64	00:45	–	
3	Плавнение с 35°С до 85°С, инкремент 0,5°С	00:05	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	50

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР.

Рекомендации по интерпретации

Интерпретация результатов выполняется по значениям температур плавления (T_m), соответствующие максимальному уровню флуоресценции по каналам детекции, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red для всех реакционных смесей и FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson для реакционной смеси С (табл. 1).

Для всех исследуемых образцов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, а также Cy5.5/Crimson для реакционной смеси С должны регистрироваться единичные пики плавления с соответствующими температурными характеристиками (T_m) в диапазоне от 45 до 80 °С. Допустимо наличие дополнительных пиков с меньшей интенсивностью флуоресцентного сигнала по сравнению с целевым пиком.

Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene Q и аналогичных в настройках следует активировать функцию «Сильный» цифровой фильтр для графика. Использовать функцию «Автошкала» для каждого флуорофора каждой реакционной смеси. При этом пороговую линию устанавливать таким образом, чтобы в температурном диапазоне от 45 до 80 °С производилась детекция одного пика (допустимо наличие дополнительных пиков с меньшей интенсивностью флуоресцентного сигнала).

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов DTrprime и аналогичных следует выбрать функцию «-dF/dT». Автоматическая детекция пиков для всех каналов детекции может быть технически недоступна, в случае этого необходимо использовать «Температурный маркер» и ручное определение температур плавления (T_m).

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов CFX96 и аналогичных пороговую линию следует устанавливать таким образом, чтобы в температурном диапазоне от 45 до 80 °С производилась детекция одного пика (допустимо наличие дополнительных пиков с меньшей интенсивностью флуоресцентного сигнала).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ПКО-1 и ПКО-2 должны детектироваться чёткие одиночные пики плавления (допустимо наличие дополнительных пиков с меньшей интенсивностью флуоресцентного сигнала) с диапазонами температур, отражёнными в таблице 9. Конкретные температуры плавления могут варьировать и зависят от используемой модели амплификатора.

При невозможности дифференциации пиков плавления программным обеспечением амплификатора, но при чёткой их визуальной дифференциации, допускается определение температур плавления ручным способом.

Для ОКО пики плавления по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 должны отсутствовать (табл. 9).

Таблица 9 – Результаты для ПКО-1, ПКО-2 и ОКО

Контрольный образец	Значения T_m по каналам детекции, соответствующим флуорофорам, °C				
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red	Cy5.5 / Crimson
реакционная смесь А					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	70–75	60–68	63–69	61–67	–
ПКО-2	66–73	52–58	54–59	55–61	–
реакционная смесь В					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	72–76	68–73	63–69	69–75	–
ПКО-2	61–68	71–77	66–71	68–73	–
реакционная смесь С					
ОКО	пики плавления отсутствуют				62–68
ПКО-1	70–80	66–72	61–67	63–69	62–68
ПКО-2	63–73	68–76	58–64	61–67	62–68

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 9, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО-1 или ПКО-2 значений, отличающихся от указанных в таблице 9, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для

ПКО-1 или ПКО-2 значений, отличающихся от указанных в таблице 9, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов исследуемых образцов

Для всех исследуемых образцов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, а также Cy5.5/Crimson для реакционной смеси С должны регистрироваться единичные пики плавления с соответствующими температурными характеристиками (T_m) в диапазоне от 50 до 80 °С. При невозможности выявления пиков температур плавления (T_m) программным обеспечением амплификатора, но при четкой их визуальной дифференциации, допускается определение температур плавления ручным способом.

По каналу Cy5.5/Crimson реакционной смеси С производится детекция внутреннего контрольного образца. По этому каналу должен регистрироваться пик с температурой плавления от 60 до 70 °С. Положительное прохождение ВКО свидетельствует об эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии в реакции ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции с ВКО и одновременном отсутствии реакций по каналам спецификации FAM/Green, Hex/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red всех реакционных смесей, результат следует считать невалидным, для данного исследуемого образца провести повторное исследование, начиная с выделения ДНК. При отсутствии реакции с ВКО, но наличии реакций по каналам спецификации FAM/Green, Hex/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red, результаты следует считать достоверными. В случае повторения невалидного результата следует заново произвести забор биоматериала у данного пациента.

Для гена *groB* (реакционная смесь А): анализируются полученные пики плавления образцов в сравнении с ПКО-1: рассчитываются значения ΔT_m по каждому каналу по формуле:

$$\Delta T_m(\text{groB}) = T_m(\text{ПКО-1}) - T_m(\text{образец}).$$

Интерпретация проводится в соответствии с таблицей 10. Для реакционной смеси А результаты по каждому из каналов учитываются по отдельности.

В случае выявления молекулярно-генетических полиморфизмов делается вывод о наличии лекарственной устойчивости штамма к рифампицину, при этом учитывается¹²:

- для канала FAM (кодоны 529–533), при $\Delta T_{m(гpoB)} = 10,5 \pm 1,5$ °C: делается вывод о наиболее вероятном наличии полиморфизма S531L;

- для канала FAM (кодоны 529–533), при $\Delta T_{m(гpoB)} = 3 \pm 0,9$ °C: делается вывод о наиболее вероятном наличии полиморфизма в 533 кодоне (например, L533R или L533P); при этом T_m образца должна соответствовать T_m в ПКО-2 ± 2 °C;

- для канала HEX (кодоны 523–528), при $\Delta T_{m(гpoB)} > 9$ °C: делается вывод о наиболее вероятном наличии полиморфизма в кодоне 526 (например, H526Y); в случае наличия полиморфизма H526Y, T_m образца должна соответствовать T_m в ПКО-2 ± 2 °C;

- для канала Cy5 (кодоны 510–516), при $\Delta T_{m(гpoB)} = 6 \pm 1$ °C: делается вывод о наиболее вероятном наличии полиморфизма в кодоне 516 (например, D516V или D516Y); в случае наличия полиморфизма D516V, T_m образца должна соответствовать T_m в ПКО-2 ± 2 °C.

Для гена *katG* (реакционные смеси В и С): анализируются полученные пики плавления образцов в сравнении с ПКО-1: рассчитываются значения ΔT_m по каждому каналу и каждой реакционной смеси по формуле:

$$\Delta T_m(katG) = T_m(\text{ПКО-1}) - T_m(\text{образец}).$$

Интерпретация проводится в соответствии с таблицей 11. В случае выявления молекулярно-генетических полиморфизмов делается вывод о наличии лекарственной устойчивости штамма к изониазиду (вне зависимости от результатов для гена *inhA*).

В случае отсутствия пиков плавления или невозможной их точной детекции для образца по одному или нескольким флуорофорам результат считается невалидным, за исключением случая, описанного в таблице 11.

¹² Наиболее вероятные полиморфизмы указаны с учётом частот их встречаемости.

Для гена *inhA* (реакционная смесь С): анализируются полученные пики плавления образцов в сравнении с ПКО-1: рассчитываются значения ΔT_m по каждому каналу:

$$\Delta T_{m(inhA)} = T_{m(ПКО-1)} - T_{m(образец)}.$$

Интерпретация проводится в соответствии с таблицей 12. В случае выявления молекулярно-генетического полиморфизма С-15Т делается вывод о наличии лекарственной устойчивости штамма к изониазиду (вне зависимости от результатов для гена *katG*).

В случае отсутствия пиков плавления или невозможной их точной детекции для образца по одному или нескольким флуорофорам результат считается невалидным.

Таблица 10 – Принцип интерпретации результатов для гена *groB* (реакционная смесь A)

	реакционная смесь А				Результат
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red	
	регионы гена, соответствующие флуорофорам				
	кодоны 529–533	кодоны 523–528	кодоны 516–522	кодоны 510–516	
ΔT _{m(groB)} , °C	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	результаты по каждому из каналов и соответствующих регионов учитываются по отдельности
	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	молекулярно-генетические полиморфизмы не выявлены
	> 2	> 2	> 2	> 2	выявлены молекулярно-генетические полиморфизмы, ассоциированные с <u>лекарственной устойчивостью к рифампицину</u> , в соответствующем регионе ¹³ . Результаты по каждому каналу учитываются отдельно
	отс.	отс.	отс.	отс.	результат анализа невалидный для соответствующего региона гена <i>groB</i>
	Дополнительная информация по выявленным полиморфизмам:				
	10,5 ± 1,5	не уч.	не уч.	не уч.	наиболее вероятный полиморфизм: S531L
	3 ± 0,9	не уч.	не уч.	не уч.	наиболее вероятные полиморфизмы: L533R / L533P
	не уч.	> 9	не уч.	не уч.	наиболее вероятные полиморфизмы кодона 526
	не уч.	не уч.	не уч.	6 ± 1	наиболее вероятные полиморфизмы: D516V / D516Y

Обозначения: «отс.» – пик плавления отсутствует в анализируемом образце или ПКО, в связи с чем вычисление $\Delta T_{m(groB)}$ невозможно; «не уч.» – значения T_m при интерпретации не учитываются.

¹³ При интерпретации лекарственной устойчивости следует учитывать разный возможный вклад отдельных мутаций в развитие резистентности и получении соответствующих минимальных ингибирующих концентраций рифампицина и его аналогов.

Таблица 11 – Принцип интерпретации результатов для кодона 315 гена *katG* (реакционные смеси В и С)

	реакционная смесь						Результат
	B				C		
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red	ROX / Orange	Cy5 / Red	
	норма	S315T1	S315T2	S315N	S315R	S315I	
$\Delta T_{m(katG)},$ °C	$\Delta T_{m(katG)} = 0 \pm 2$ по всем каналам						Полиморфизм в 315-м кодоне не выявлен
	$\Delta T_{m(katG)} < - 2$ по одному из каналов: канал с наименьшим $\Delta T_{m(katG)}$ соответствует выявленному полиморфизму, при этом допускается отсутствие пика плавления по одному из каналов						Выявлен соответствующий молекулярно- генетический полиморфизм кодона 315, ассоциированный с <u>лекарственной</u> <u>устойчивостью к</u> <u>изониазиду</u> . В случае S315T1, T_m по всем каналам должны соответствовать T_m в ПКО-2 ± 2 °C
	$\Delta T_{m(katG)} > 2$ или отсутствует						Результат невалидный

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для гена *inhA* (реакционная смесь С)

	реакционная смесь С		Результат
	FAM / Green	HEX / Yellow	
	норма	(C-15T)	
$\Delta T_{m(90\%)}^{\circ C}$	0 ± 2	0 ± 2	полиморфизмы в регионе -20...+6, не обнаружены
	не уч.	-5 ± 1	обнаружен молекулярно-генетический полиморфизм C-15T, ассоциированный с <u>декастерной устойчивостью к изониазиду</u> , при этом T_m образца должна соответствовать T_m в ПКО-2 $\pm 2^{\circ}C$
	> 2	> 2	полиморфизм C-15T не обнаружен (возможно наличие других полиморфизмов в регионе гена -20...+6 – например, A-16G, T-8A, T-8C)
	другие значения $\Delta T_{m(90\%)}^{\circ C}$ или отсутствует		результат невалидный

Причиной получения невалидного результата может служить использование клинического материала не содержащего ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса, низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР; наличие в образце нескольких штаммов микобактерий туберкулёзного комплекса, несущих разные мутации анализируемых регионов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, и др.

В случае невалидного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ. При повторении невалидного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор реагентов «MTB-RESIST-I-тест» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 18 до минус 22 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от 2 до 8 °С до 5 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора «MTB-RESIST-I-тест» не более 5 раз.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «MTB-RESIST-I-тест» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от минус 18 до минус 22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности

Срок годности набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест» – 12 месяцев со дня приёмки ОТК предприятия-изготовителя при

соблюдении всех условий транспортирования и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 22 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

Один час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «MTB-RESIST-I-тест» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении иретензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»)

432072, г. Ульяновск, 44-й Инженерный проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава Россин от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования

**Символы и обозначения, использованные при маркировке
набора реагентов**

Символ	Расшифровка
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии
	Дата изготовления
	Использовать до...
	Количество определений
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению

Версия 4 от 03.08.2022

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

28 (двадцать восемь) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.П. *А.П. Тороповский*

