



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«27» июля 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для качественного выявления ДНК
микобактерий туберкулёзного и нетуберкулёзного
комплекса и их дифференциации
методом мультиплексной ПЦР-РВ
«МТВ-тест»
по ТУ 21.20.23-023-97638376-2020**

Версия 4 от 27.07.2022

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

Введение.....	4
1. Назначение.....	6
2. Принцип метода	7
3. Состав набора реагентов	9
4. Характеристики набора реагентов	11
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «МТВ-тест».....	18
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	19
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	22
8. Анализируемые образцы	23
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	30
10. Проведение анализа	31
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	33
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора.....	35
13. Утилизация	37
14. Гарантийные обязательства, контакты	38
Приложение А	39
Приложение Б.....	40

Введение

Инфекционные заболевания, вызванные микроорганизмами рода *Mycobacterium* (включая близкородственные роды *Mycolicibacterium* и *Mycobacteroides*), в особенности микобактериями туберкулезного комплекса, являются одной из причин снижения качества жизни, часто приводят к летальному исходу. Диагностика таких инфекций способствует своевременному лечению заболеваний, выбору адекватной терапии, мониторингу течения заболевания и оценке эффективности лечения, а также проведению соответствующих противоэпидемиологических мероприятий.

Целевые аналиты: специфичные участки геномной ДНК микобактерий (роды *Mycobacterium*, *Mycolicibacterium* и *Mycobacteroides*) и микобактерий туберкулезного комплекса.

Научная обоснованность целевого аналита заключается в специфичности целевого аналита (уникальности последовательности ДНК) в отношении геномов микроорганизмов – микобактерий туберкулезного и нетуберкулезного комплекса (включая близкородственные роды *Mycolicibacterium* и *Mycobacteroides*).

В соответствии с Клиническими рекомендациями «Туберкулез у взрослых», А15-А19 (утв. Минздравом России, год утверждения 2020 г.)

«Для лабораторной диагностики туберкулеза используют любой доступный для исследования материал в соответствии с локализацией процесса: мокроту, бронхоальвеолярный смыв, исследование плевральной, синовиальной, асцитической жидкостей. Больным с подозрением на ВЛТ при соответствующей локализации так же возможно исследование осадка мочи, эякулята, секрета простаты, менструальной крови, отделяемого из уха, отделяемого свищей, пуктатов, биоптатов, ликвора и др.

Рекомендуется проведение как минимум двукратного исследования мокроты с интервалом в 2-3 дня или иного диагностического материала (молекулярно-биологическое исследование мокроты, бронхоальвеолярной жидкости, промывных вод бронхов, плевральной жидкости, нативного препарата тканей трахеи и бронхов или парафинового блока, другого диагностического материала на микобактерии туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) с применением комплекса микробиологических и

молекулярно-генетических методов пациентам с подозрением на туберкулез для выявления МБТ».

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению:

Показания к применению: набор реагентов «МТВ-тест» рекомендуется применять при подозрении у пациентов на лёгочный и внелёгочный туберкулёз, микобактериозы.

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 «МТВ-тест» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «МТВ-тест» предназначен для качественного выявления специфичных участков геномной ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*) и нетуберкулезного комплекса (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. terrae*), *Mycobacterium* spp., и *Mycobacteroides* spp. и их дифференциации методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробе ДНК, 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, смывы с объектов окружающей среды), у пациентов с подозрением на лёгочный и внелёгочный туберкулёз, микобактериозы.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для диагностики заболеваний, вызванных микобактериями туберкулёзного комплекса (туберкулёз) и микобактериями нетуберкулёзного комплекса (микобактериозы).

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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются: 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, смывы с объектов окружающей среды.

Принцип определения

Качественное выявление ДНК микобактерий туберкулёзного и нетуберкулёзного комплексов с их дифференциацией (*Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium sensu lato*, включая близкородственные роды *Mycobacterium* и *Mycobacteroides*) методом мультиплексной ПЦР в реальном времени в пробе ДНК, выделенной из клинического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
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 входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер. Наличие фермента урацил-ДНК-гликозидаза препятствует получению ложноположительных результатов при контаминации продуктами амплификации, при этом фермент полностью инактивируется в процессе первого цикла денатурации ДНК и не препятствует амплификации продуктов текущей реакции.

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушител, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) ДНК микобактерий туберкулёзного и нетуберкулёзного комплексов с их дифференциацией, а также ВКО (табл. 1). Дифференциация микобактерий туберкулёзного комплекса производится по одновременному выявлению маркеров *IS6110*, *IS1081*, при этом выявление хотя бы одного из маркеров свидетельствует о нахождении микобактерий туберкулёзного комплекса.

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору		
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (<i>IS6110</i> , <i>IS1081</i>)	ВКО	<i>Mycobacterium</i> sp. (включая <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Mycobacteroides</i> sp.)

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

Ограничения метода

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.

Время проведения реакции мультиплексной ПЦР составляет от 90 до 110 минут (без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «МТВ-тест» выпускается в одной форме комплектации – «МТВ-тест».

Количество анализируемых проб

Набор реагентов выпускается в одной форме комплектации (табл. 2), рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Таблица 2 – Состав набора реагентов «МТВ-тест»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
3	Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 160 мкл
4	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 1 600 мкл
5	Внутренний контрольный образец (ВКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл

Состав набора

ПЦР-буфер 5x готов к использованию и представляет собой буфер, содержащий термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим

стартом», дНТФ (включая дУТФ), урацил-ДНК-гликозилазу (UDG) и оптимизированный для ПЦР буфер.

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

Прохождение реакции по HEX/Yellow Ct≤32 говорит об эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции по каналу HEX/Yellow или Ct>32 и одновременном отсутствии реакции по каналам спецификации FAM/Green и ROX/Orange, 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 (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: специфичные фрагменты ДНК *Mycobacterium sp.* (включая близкородственные роды *Mycolicibacterium sp.* и *Mycobacteroides sp.*), *M. tuberculosis complex*, ВКО.

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

Наименование показателя	Характеристики и нормы		Методы контроля по ТУ
1. Технические характеристики			
1.1.	Внешний вид	Объем реагентов, мкл (±5%)	
ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 1440 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 160 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, 1600 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-023-97638376-2020		Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-023-97638376-2020		Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-023-97638376-2020		Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики			
2.1. Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM, ROX и HEX Ct≤30.		Раздел 7, пункт 7.8.1
2.2. Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM, ROX Ct>35 или не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct>32.		Раздел 7, пункт 7.8.1
2.3 Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM и ROX Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct≤32.		Раздел 7, пункт 7.8.2
2.4 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ-1 по каналам FAM и HEX во всех повторях (не менее 3) Ct≤35 и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 5%.		Раздел 7, пункт 7.8.2
	В пробирках с КОЧ-2 по каналам FAM и HEX во всех повторях (не менее 3) Ct≤35 и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 5%.		

	В пробирках с КОЧ-3 по каналам HEX и ROX во всех повторях (не менее 3) $C_t \leq 35$ и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 5%.	
--	---	--

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

- контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ-1, КОЧ-2 и КОЧ-3), представляющий собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной ДНК микобактерий и фрагмента генома бактериофага 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) в объеме 4,5 мкл с добавлением 0,5 мкл ВКО согласно инструкции

4.2 Характеристики аналитической эффективности

Таблица 4 – Характеристики аналитической эффективности набора реагентов «МТВ-тест»

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к ДНК: по каналу FAM: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex, включая <i>M. tuberculosis</i>, <i>M. bovis</i>, <i>M. bovis</i> BCG, <i>M. africanum</i>, <i>M. canettii</i>, <i>M. caprae</i>, <i>M. microti</i>; по каналу ROX: <i>Mycobacterium</i> sp., а также близкородственных видов из родов <i>Mycolicibacterium</i>, <i>Mycobacteroides</i>. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК: по каналу FAM: ДНК нетуберкулезные микобактерии <i>Mycobacterium</i> sp. (<i>M. avium</i>, <i>M. abscessus</i>, <i>M. septicum</i>, <i>M. fortuitum</i>, <i>M. gordonae</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. kansasii</i>, <i>M. marinum</i>, <i>M. smegmatis</i>, <i>M. xenopi</i>, <i>M. ulcerans</i>, <i>M. terrae</i>), <i>Mycolicibacterium</i> spp., <i>Mycobacteroides</i> spp., а также ДНК гетерологичных микроорганизмов <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenza</i>, <i>Corynebacterium jeikeium</i>, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>, <i>Chlamydomydia pneumoniae</i>, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Human herpesvirus 5</i>, <i>Human herpesvirus 1</i>, <i>Human herpesvirus 2</i>, а также препарата геномной ДНК человека Jurkat (в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл);

	по каналу ROX: микобактерии туберкулезного комплекса (<i>M. tuberculosis</i>, <i>M. bovis</i>, <i>M. bovis</i> BCG, <i>M. africanum</i>, <i>M. canettii</i>, <i>M. caprae</i>, <i>M. microti</i>), а также ДНК гетерологичных микроорганизмов <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenza</i>, <i>Corynebacterium jeikeium</i>, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>, <i>Chlamydomydia pneumoniae</i>, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Human herpesvirus 5</i>, <i>Human herpesvirus 1</i>, <i>Human herpesvirus 2</i>, а также препарата геномной ДНК человека Jurkat (в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл).
Аналитическая чувствительность	Для микобактерий туберкулёзного комплекса (канал FAM): не менее 100 копий геномной ДНК на 1 мл биоматериала, при условии выделения ДНК из 100 мкл образца и элюции объемом 50 мкл. Для микобактерий (канал ROX): не менее 1 000 копий геномной ДНК на 1 мл биоматериала, при условии выделения ДНК из 100 мкл образца и элюции объемом 50 мкл
Прецизионность в условиях повторяемости	Для оценки прецизионности в условиях повторяемости контрольные образцы чувствительности и специфичности были исследованы по 10 повторам. 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 повторам контрольных образцов. Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 5%.
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 наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 8%.
--

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний был использовано **243 охарактеризованных клинических образца** (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, смывы с объектов окружающей среды) от пациентов с диагнозом лёгочный и внелёгочный туберкулёз, микобактериозы, которые были получены из банка остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики Государственного бюджетного учреждения здравоохранения "Самарский областной клинический противотуберкулёзный диспансер имени Н.В.Постникова" и переданы ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Для оценки перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «МТВ-тест» были исследованы также **37 образцов**, не содержащих исследуемые аналиты, но с подтвержденным положительным наличием гетерологичных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Human herpesvirus 5*, *Human herpesvirus 1*, *Human herpesvirus 2* отобранных из банка остаточных аликвот, сформированного из пула образцов, поступающих на тестирование в ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Данные клинические образцы от пациентов с диагнозом лёгочный и внелёгочный туберкулёз, микобактериозы были исследованы в ходе лечебно-диагностического процесса ГБУЗ "Самарский областной клинический противотуберкулёзный диспансер имени Н.В.Постникова" в соответствии с Клиническими рекомендациями «Туберкулёз у взрослых», А15-А19 (утв.

Минздравом России, год утверждения 2020 г.) и охарактеризованы с помощью зарегистрированных медицинских изделий»

- «Реагенты GenoType Mycobacterium CM для определения *Mycobacterium tuberculosis*», производства «Хайн Лайфсайенс ГмбХ», Германия, регистрационное удостоверение ФСЗ 2008/02294 от 15.07.2008 г. – выявляет микобактерии туберкулёзного комплекса (но не дифференцирует их) и нетуберкулёзного комплекса;

- «Реагенты Geno Type MTBC для определения *Mycobacterium tuberculosis* методом ПЦР-диагностики in vitro», производства «Хайн Лайфсайенс ГмбХ», Германия, регистрационное удостоверение ФСЗ 2008/02297 от 15.07.2008 г. - выявляет микобактерии туберкулёзного комплекса и дифференцирует их

- «Реагенты Geno Type Mycobacterium AS для определения *Mycobacterium tuberculosis* методом ПЦР-диагностики in vitro», производства «Хайн Лайфсайенс ГмбХ», Германия, регистрационное удостоверение ФСЗ 2008/02296 от 15.07.2008 г. - предназначен для идентификации следующих видов нетуберкулёзных микобактерий: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, and *M. shimoidei*.

В ходе проведенных клинических испытаний отказов в работе не было. Наборы продемонстрировали высокую надежность.

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).

Воспроизводимость результатов 100%.

Выделение ДНК из клинических образцов осуществлялось с помощью, рекомендованных в инструкции по применению исследуемого набора «МТВ-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, смывов с объектов окружающей среды - 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 с помощью исследуемого набора реагентов «МТВ-тест» в двух сериях и полученные данные сравнивались с результатами, полученными ГБУЗ "Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер имени Н.В.Постникова» для данных образцов в ходе лечебно-диагностического процесса.

Таблица 5 – Характеристики клинической эффективности

Вид исследуемого материала	Исследуемый анализ	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с достоверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с достоверительной вероятностью 95 %
Мокрота	микобактерии туберкулезного комплекса	50	46	100% (95% ДИ: 92,89%-100%)	100% (95% ДИ: 92,29%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	16	80	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)	100% (95% ДИ: 95,49%-100%)
Бронхоальвеолярный лаваж	микобактерии туберкулезного комплекса	28	20	100% (95% ДИ: 87,66%-100%)	100% (95% ДИ: 83,16%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	8	40	100% (95% ДИ: 63,06%-100%)	100% (95% ДИ: 91,19%-100%)

Промывные воды бронхов	микобактерии туберкулезного комплекса	38	26	100% (95% ДИ: 90,75%-100%)	100% (95% ДИ: 86,77%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	18	46	100% (95% ДИ: 81,47%-100%)	100% (95% ДИ: 92,29%-100%)
Промывные воды желудка	микобактерии туберкулезного комплекса	26	10	100% (95% ДИ: 86,77%-100%)	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	10	26	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 86,77%-100%)
Плевральная жидкость	микобактерии туберкулезного комплекса	24	10	100% (95% ДИ: 85,75%-100%)	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	8	26	100% (95% ДИ: 63,06%-100%)	100% (95% ДИ: 86,77%-100%)
Кровь	микобактерии туберкулезного комплекса	62	16	100% (95% ДИ: 94,22%-100%)	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	16	62	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)	100% (95% ДИ: 94,22%-100%)
Моча	микобактерии туберкулезного комплекса	30	30	100% (95% ДИ: 88,43%-100%)	100% (95% ДИ: 88,43%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	14	46	100% (95% ДИ: 76,84%-100%)	100% (95% ДИ: 92,29%-100%)
Культуры микроорганизмов	микобактерии туберкулезного комплекса	12	14	100% (95% ДИ: 73,54%-100%)	100% (95% ДИ: 76,84%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	14	12	100% (95% ДИ: 76,84%-100%)	100% (95% ДИ: 73,54%-100%)
Секрет простаты	микобактерии туберкулезного комплекса	10	8	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 63,06%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	8	10	100% (95% ДИ: 63,06%-100%)	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)
Тканевой (биопсийный и операционный) материал	микобактерии туберкулезного комплекса	18	10	100% (95% ДИ: 81,47%-100%)	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)
	микобактерии нетуберкулезного комплекса	10	18	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 81,47%-100%)

Синовиальная жидкость	микобактерии туберкулёзного комплекса	10	4	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 39,76-15,8%-100%)
	микобактерии нетуберкулёзного комплекса	4	10	100% (95% ДИ: 39,76-15,8%-100%)	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)
Перикардальная жидкость и спинномозговая жидкость	микобактерии туберкулёзного комплекса	6	4	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)	100% (95% ДИ: 39,76-15,8%-100%)
	микобактерии нетуберкулёзного комплекса	4	6	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)
Спинномозговая жидкость	микобактерии туберкулёзного комплекса	10	10	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)
	микобактерии нетуберкулёзного комплекса	4	16	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)
Смывы с объектов окружающей среды	микобактерии туберкулёзного комплекса	16	12	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)	100% (95% ДИ: 73,54%-100%)
	микобактерии нетуберкулёзного комплекса	12	16	100% (95% ДИ: 73,54%-100%)	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «МТВ-тест»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
- Перекрестная контаминация образцов
- Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;
- Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;
- 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 ДНК микобактерий туберкулёзного и нетуберкулёзного комплекса и их дифференциации методом мультиплексной ПЦР-РВ «МТВ-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 «МТВ-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 «МТВ-тест», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «МТВ-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 нуклеиновых 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 противотуберкулёзных 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 (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал (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. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

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

4. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

5. Амплификатор¹ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

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 объёмом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 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. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 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: 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, смывы с объектов окружающей среды.

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

¹ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

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, перикардиальная 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 троекратное 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 секрет в количестве 0,5–1 мл собирают в одноразовую стерильную сухую пластиковую пробирку объёмом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и маркируют.

Синовиальная жидкость. Собирать в одноразовые плотно завинчивающиеся ёмкости.

Тканевой (биопсийный и операционный) материал. Следует помещать в одноразовые вакуумные пробирки с консервантом ЭДТА или одноразовые завинчивающиеся пробирки объёмом 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. Требуется концентрация – не более 50 000 – 100 000 клеток в 1 мл.

Смывы с объектов окружающей среды. Производятся с помощью зонд-тампонов, смоченных стерильным физиологическим раствором, с поверхности площадью около 10 см², после чего рабочая часть зонда помещается в пробирку объёмом 1,5 мл, содержащую около 500 мкл стерильного физиологического раствора, а верхняя часть зонда отламывается и удаляется.

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, смывы с объектов окружающей среды: 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 муколизинном (ПУ №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, смывы с объектов окружающей среды. 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. Предварительная обработка пробы секрета простаты, собранной после предварительного массажа простаты через прямую кишку, не требуется. При невозможности получить секрет, сразу после массажа простаты, собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл (см. правила забора мочи). 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 СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", 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, 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, перикардальной жидкости и спинномозговой жидкости, смывов с объектов окружающей среды - 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 «МТВ-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.

8.3. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «МТВ-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;

3) вещества, встречающиеся при процедуре забора клинического материала - в данном случае, антикоагулянты, содержащиеся в пробирке для забора крови.

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

Тип	Вещество	Активный компонент	Концентрация
Эндогенные		гемоглобин	260 мкг/мл

Экзогенные	Биологические агенты	гиалуроновая кислота	50 мкг/мл
	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 аminosалициловой кислоты. Противотуберкулезный препарат.	капреомицин	0,2 мг/мл
	Антибиотик. Противотуберкулезный препарат	циклосерин	0,05 мг/мл
	Вещества, встречающиеся при процедуре забора крови (антикоагулянты)	Гепарин (антикоагулянт)	0,15 МЕ/мл
		Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 мМ/мл
		ЭДТА-К2 (антикоагулянт)	0,5 мМ/мл

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесен гепарин в концентрации 0,15 МЕ/мл и цитрат натрия в концентрации 0,1 мМ/мл, применяемые как антикоагулянты при заборе крови. Не допускается использование

гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови.

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;

- не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови.

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, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вихре в 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 для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов² + 1 ПКО + 1 ОКО.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;

2. ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

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 объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции.

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер 5х – 5 мкл,

2. Смесь олигонуклеотидов – 15 мкл,

3. Образец (исследуемый образец ДНК, ПКО, 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: (n+3)х5 мкл ПЦР-буфера 5х и (n+3)х15 мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов.

3. В каждую пробирку для ПЦР внести по 20 мкл приготовленной реакционной смеси.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл выделенной ДНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат ДНК не вносится.

5. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ПКО.

6. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ОКО.

² Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторях.

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

Б) ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации 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 и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Тип анализа: количественный со стандартами. Протокол ПЦР указан в таблице 6.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (возможна регистрация сигнала VIC каналом ROX в случае $\Delta Rn > 100\,000$, что может привести к получению ложноположительных результатов)! Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

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 и ROX/Orange.

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 6 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00		
2	95	00:15		5
	64	00:45		
3	95	00:15		45
	64	00:45	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange	

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала детекции на уровне, соответствующем 10–20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange (табл. 1). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 3 – см. табл. 6).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения C_t в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ОКО и ПКО должны быть получены следующие результаты (табл. 7).

Таблица 7 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам		
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange
ОКО	>35 или отсутствует	>32 или отсутствует	>35 или отсутствует
ПКО	≤30	≤30	≤30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов

Принципы интерпретации результатов отражены в таблице 8.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

Таблица 8 – Принцип интерпретации результатов

Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			Результат
FAM / Green	ROX / Orange	HEX / Yellow (BKO)	
–	–	≤ 32	ДНК микобактерий туберкулёзного и нетуберкулёзного комплекса не обнаружена
–	–	> 32	результат невалидный
≤ 35	не уч.	не уч.	обнаружена ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса
–	≤ 35	не уч.	обнаружена ДНК нетуберкулёзных микобактерий (<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Mycolicibacterium</i> sp., <i>Mycobacteroides</i> sp.).
> 35 по одному или всем каналам		не уч.	результат теста сомнительный для мишени, соответствующей каналу

Обозначения: «не уч.» – результат при интерпретации не учитывается; «–» – сигнал флуоресценции отсутствует.

Причиной получения сомнительного результата может служить небольшая концентрация микроорганизма в клиническом образце.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор реагентов «МТВ-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 30 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора «МТВ-тест» не более 10 раз.

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

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «МТВ-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 30 суток, или при температуре от 15 до 25 °С не более 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 холодоэлементами. Тип, объём и количество холодоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём 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 «МТВ-тест» - 12 месяцев со дня приемки 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 «МТВ-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 «МТВ-тест» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий 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 России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

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

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

Приложение Б

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

12 (двенадцать)) листов

Должность: ген. директор

Гороновский А.Н.

