УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «НПФ Синтол»

А.В. Кузубов
«__» _____ 2023 г.

Медицинское изделие для диагностики ин витро

Набор реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) и нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), а также дифференциальной диагностики видов НТМБ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)
«Амплитуб-НТМБ - дифференциация»

ИНСТРУКЦИЯ по применению

2023

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

СОДЕРЖАНИЕ

1.1 Полное наименование набора 4
1.2 Назначение медицинского изделия и диагностическая роль 4
1.3 Показания и противопоказания к применению медицинского изделия 4
1.4 Потенциальные потребители медицинского изделия 5
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА 6
2.1 Состав набора 6
2.2 Метод исследования 7
2.3 Ограничения метода 10
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 10
3.1 Аналитические характеристики 11
3.1.1 Чувствительность 11
3.1.2 Специфичность 11
3.1.3 Повторяемость и воспроизводимость 12
3.2 Диагностические характеристики 13
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ 16
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ 21
5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование 21
5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования 22
5.3 Дозирующие устройства 22
5.4 Другое используемое оборудование 22
5.5 Лабораторная посуда 22
5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора 23
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ 23
6.1 Условия хранения анализируемых проб (образцов ДНК) 24
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 24
7.1 Подготовка и проведение ПЦР-РВ 24
7.2 Анализ и интерпретация результатов 27
7.3 Возможные ошибки 43
8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА 44
8.1 Условия хранения набора 44
8.2 Условия транспортирования набора 44
8.3 Срок годности набора 45
8.4 Информация по безопасной утилизации 45
8.5 Гарантийные обязательства производителя 46
9. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА 47

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

НТМБ	- нетуберкулезные микобактерии
МБТК	- Микобактерии туберкулезного комплекса – *Mycobacterium tuberculosis* complex
ПЦР-РВ	- полимеразная цепная реакция в реальном времени
МАНК	- методы амплификации нуклеиновых кислот
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ВПК	- внутренний положительный контроль
ТКО	- твердые коммунальные отходы
ПО	- программное обеспечение
ГЭ	- геном эквивалент

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1.НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) и нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), а также дифференциальной диагностики видов НТМБ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) «Амплитуб-НТМБ-дифференциация».

1.2 Назначение медицинского изделия и диагностическая роль

Набор реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» предназначен для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий, а также дифференциальной диагностики 12 видов нетуберкулезных микобактерий (*M.avium, M.intracellulare, M.xenopi, M.chimaera, M.kansasii, M.gordonae, M.lentiflavum, M.paragordonae, M.abscessus, M.chelonae, M.fortuitum, M.malmoense*) в культуре микобактерий и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования как ускоренного метода обнаружения МБТК и/или НТМБ при исследовании материала от больного туберкулезом или диагностического пациента при постановке диагноза и начале лечения.

1.3 Показания и противопоказания к применению медицинского изделия

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика туберкулеза и микобактериоза, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, в лабораториях медицинских организаций, оказывающих специализированную медицинскую помощь по профилю «фтизиатрия», в научно-исследовательских лабораториях и учреждениях.

Лабораторное исследование на наличие ДНК МБТК и/или НТМБ с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

проводится в ходе обследования больных туберкулезом/микобактериозом или диагностических пациентов при постановке диагноза, начале лечения и контроле процесса антибиотикотерапии. Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования возбудителями туберкулеза и/или микобактериоза и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решений о лечении пациентов.

В ходе менеджмента риска установлено, что применение изделия для диагностики ин витро «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» не создает прямого риска для пациента или обследуемого лица, так как его не применяют наружно или внутренне (энтерально). Следовательно, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению, отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Применять набор реагентов следует строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

Набор реагентов не подлежит использованию в случаях:

— нарушения внутренней упаковки;

— отсутствия соответствия между описанием и внешним видом реагентов;

— несоблюдения условий транспортирования и хранения согласно инструкции;

— истечения срока годности.

1.4 Потенциальные потребители медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускается только квалифицированный медицинский персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также меднцинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

«Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 3 компонентов, инструкции по применению и паспорта качества.

Набор реагентов рассчитан на определение **48 образцов** и включает **72 стрипа,** включая контрольные образцы.

В наборе использованы стрипы, каждый из которых предназначен для анализа 1 образца и содержит 4 пробирки с раскапанными различными концентрированными реакционными смесями, предназначенными для выявления ДНК МБТК и/или НТМБ. Первая пробирка каждого стрипа промаркирована.

№	Наименование	Объем	Кол-во
1	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, **РС-Р НТМБ-Дифф**	0,005 мл	10 упаковок по 6 стрипов по 4 микропробирки
2	Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы ДНК МБТК и НТМБ, в стрипованных микропробирках, **ПКО-МБТК-НТМБ**	0,005 мл	2 упаковки по 6 стрипов по 4 микропробирки
3	Деионизированная вода, **ddH_2O**	1,7 мл	2 пробирки
4	Инструкция по применению	-	1 штука
5	Паспорт качества	-	1 штука

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2.2 Метод исследования

Обнаружение фрагментов ДНК микобактерий основано на использовании метода мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени. В основе метода ПЦР-РВ лежит изменение сигнала флуоресценции в ходе реакции амплификации специфичных фрагментов ДНК, которая заключается в повторяющихся температурных циклах. Каждый этап состоит из денатурации цепи ДНК, отжига праймеров для связи со своими комплементарными последовательностями на одноцепочечной ДНК-матрице и последующей элонгации матричной цепи ДНК-полимеразой. Изменение флуоресцентного сигнала происходит благодаря использованию специфического для искомой последовательности ДНК олигонуклеотидного зонда, который связывается в ходе реакции с одной из цепей ампликона. Зонд содержит на 5' конце флуоресцентный краситель, а на 3' конце - гаситель флуоресценции. В ходе синтеза комплиментарной цепи, благодаря 5'-3' экзонуклеазной активности термостабильной полимеразы, зонд расщепляется. После расщепления происходит разобщение красителя и гасителя, что приводит к пропорциональному по отношению к накопленному продукту реакции возрастанию сигнала флуоресценции. Изменение сигнала флуоресценции позволяет проследить кинетику ПЦР и использовать полученные данные для расчета значения порогового цикла – величины, лежащей в основе расчета исходного числа копий ДНК в образце и позволяющей сравнивать образцы между собой.

В наборе использованы стрипы, каждый из которых предназначен для анализа 1 образца и содержит 4 пробирки с раскапанными различными концентрированными реакционными смесями, предназначенными для выявления ДНК МБТК и/или НТМБ (1 пробирка) и клинически значимых *видов нетуберкулезных микобактерий (2-4 пробирки) (таблица 1). Каждая*

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

пробирка представляет собой мультиплексную систему, включающую 4 или 5 независимых реакций, проходящих в одной пробирке одновременно.

В первой пробирке стрипа выявляются по соответствующему каналу:

- генетический маркер принадлежности к МБТК – мультикопийная вставка IS*6110* – FAM;
- генетический маркер МБТК – однокопийный ген – R6G/HEX/VIC;
- специфические фрагменты генов клинически значимых видов НТМБ – ROX;
- ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК) – Cy5.5.

Во **второй** пробирке стрипа выявляются по соответствующему каналу:

- *Mycobacterium intracellulare (M.intracellulare)* – FAM;
- *Mycobacterium avium (M.avium)* – R6G/HEX/VIC;
- *Mycobacterium xenopi (M.xenopi)* – ROX;
- *Mycobacterium chimaera (M.chimaera)* – Cy5;
- ВПК – Cy5.5.

В третьей пробирке стрипа выявляются по соответствующему каналу:

- *Mycobacterium kansasii (M.kansasii)* – FAM;
- *Mycobacterium lentiflavum (M.lentiflavum)* – R6G/HEX/VIC;
- *Mycobacterium gordonae (M.gordonae)* – ROX;
- *Mycobacterium paragordonae (M.paragordonae)* – Cy5;
- ВПК – Cy5.5.

В четвёртой пробирке стрипа выявляются по соответствующему каналу:

- *Mycobacterium abscessus (Mycobacteroides abscessus, M.abscessus)* – FAM;
- *Mycobacterium fortuitum (Mycolicibacterium fortuitum, M.fortuitum)* – R6G/HEX/VIC;
- *Mycobacterium chelonae (Mycobacteroides chelonae, M.chelonae)* – ROX;
- *Mycobacterium malmoense (M.malmoense)* – Cy5;
- ВПК – Cy5.5.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таким образом, по каналу Cy5.5 детектируется ДНК ВПК, по каналам FAM, R6G(HEX), ROX и Cy5 определяются специфические фрагменты ДНК микобактерий.

Положительная динамика изменения флуоресценции по реакции ВПК (Cy5.5) в случае отсутствия положительной динамики по специфическим реакциям (FAM, R6G/HEX/VIC, ROX и Cy5) подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК микобактерий в исследуемом образце. Отсутствие положительной динамики изменения флуоресценции по всем каналам свидетельствует об ингибировании ПЦР, что позволяет исключить недостоверный отрицательный результат.

Таблица 1 – Реакции и соответствующие им каналы детекции продуктов амплификации ПЦР-РВ.

№ пробирки в стрипе	Определяемые мишени (микобактерии/ вид НТМБ) по каналам				
	FAM	R6G/HEX/VIC	ROX	Cy5	Cy5.5
1	*МБТК*	*МБТК*	*НТМБ*	[redacted]	ВПК
2	*M.intracellulare*	*M.avium*	*M.xenopi*	*M. chimaera*	ВПК
3	*M.kansasii*	*M.lentiflavum*	*M.gordonae*	*M.paragordonae*	ВПК
4	*M.abscessus*	*M.fortuitum*	*M.chelonae*	*M. malmoense*	ВПК

Положительный результат анализа ПЦР-РВ означает, что исследуемый материал содержит ДНК МБТК и/или НТМБ. В положительном на НТМБ исследуемом материале дополнительно определяется конкретный вид среди 12 наиболее клинически значимых видов НТМБ. Отрицательный результат означает, что в исследуемом материале не обнаружено ДНК МБТК и НТМБ, выявляемых данным набором.

Общее время выполнения процедуры проведения ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» зависит от модели амплификатора для ПЦР-РВ не превышает 1,5 ч с учетом работы амплификатора. Полное ПЦР-исследование состоит из этапов выделения ДНК и реакции ПЦР-РВ амплификации ДНК. Реагенты для выделения ДНК не включены в состав набора. Выделение ДНК проводят с использованием наборов, зарегистрированных в установленном порядке в

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Российской Федерации (например, «Амплитуб-РВ», ООО «Синтол», ФСР 2010/07635). Время проведения полного ПЦР-анализа зависит от набора выделения ДНК и модели амплификатора для ПЦР-РВ и составляет от 2 часов, включая выделение ДНК.

2.3 Ограничения метода

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР-РВ и/или недостаточное количество ДНК в исследуемой пробе. Это может быть вызвано некачественной предобработкой биологического материала и/или недостаточной эффективностью выделения ДНК. Поэтому, при проведении ПЦР-РВ используют ВПК, который содержится в каждой пробирке с реакционной смесью набора реагентов. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью специфического зонда, детектирующего ДНК ВПК.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация отрицательного образца соседними положительными образцами на этапах выделения ДНК, либо проведения ПЦР-РВ. Для выявления контаминации применяются отрицательные контрольные образцы ПЦР-РВ (ОКО).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитические характеристики набора реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий, а также дифференциальной диагностики видов нетуберкулезных микобактерий методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» – специфичность, чувствительность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) – были установлены в ходе валидации набора реагентов на базах ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2) и ООО «НПФ Синтол» (г. Москва). Набор реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» валидирован при использовании набора реагентов «Амплитуб-РВ» (ООО

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

«Синтол», Россия, ФСР 2010/07635) для выделения ДНК микобактерий из клинических образцов и культур клеток (на магнитных частицах).

3.1 Аналитические характеристики

3.1.1 Чувствительность

Аналитическая чувствительность установлена путём анализа серийных разведений ДНК из культур штаммов целевых видов микобактерий: *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium xenopi, Mycobacterium avium, Mycobacterium chimaera, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium gordonae, Mycobacterium lentiflavum, Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium malmoense, Mycobacterium peregrinum, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium terrae, Mycobacterium nonchromogenicus, Mycobacterium scrofulaceum, Mycobacterium simiae,* а также двух серий стандартных контрольных образцов (СКО).

Аналитическая чувствительность с воспроизводимостью 95 % составляет:

- на определение принадлежности микроорганизма к микобактериям туберкулезного комплекса – не более $5{,}0 \times 10^2$ ГЭ/мл (10 ГЭ на амплификационную пробирку);
- на определение принадлежности микроорганизма к нетуберкулезным микобактериям – не более $5{,}0 \times 10^2$ ГЭ/мл (10 ГЭ на амплификационную пробирку) с воспроизводимостью 95 %;
- на определение вида нетуберкулезных микобактерий – не более $5{,}0 \times 10^2$ ГЭ/мл (10 ГЭ на амплификационную пробирку) с воспроизводимостью 95%.

3.1.2 Специфичность

Аналитическая специфичность анализа – 100%, определяется используемыми праймерами и флуоресцентными зондами, строго специфичными в отношении уникальных фрагментов генома микобактерий МБТК и НТМБ. Набор реагентов выявляет ДНК микобактерий,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

принадлежащих к МБТК и следующим видам НТМБ: *M.avium, M.intracellulare, M.xenopi, M.chimaera, M.kansasii, M.gordonae, M.lentiflavum, M.paragordonae, M.abscessus, M.chelonae, M.fortuitum, M.malmoense.*

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов/штаммов: 700403 *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* TMC 102; вакцинный штамм *Mycobacterium bovis* BCG; ATCC-35719 *Mycobacterium avium subsp. avium* Strain TMC 801; ATCC-19977 *Mycobacterium abscessus* L948; ATCC-35749 *Mycobacterium chelonae* TMC 1524 [ATCC 23000, SN 281]; ATCC-6841 *Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum;* ATCC-700686 *Mycolicibacterium peregrinum*; ATCC-35756 *Mycobacterium gordonae; Mycobacterium paragordonae (M.paragordonae);* ATCC-25120 *Mycobacterium inracellulare, M.intracellulare subs. chimaera (M.chimaera);* ATCC-12478 *Mycobacterium kansasii; Mycobacterium malmoense; Mycolicibacter nonchromogenicus (M.nonchromogenicus); Mycolicibacterium scrofulaceum (M.scrofulaceum);* ATCC-14468 *Mycobacterium smegmatis* W-113; *Mycobacterium simiae (M.simiae);* ATCC-19250 *Mycobacterium xenopi;* штамм № B-7502 *Mycobacterium terrae* TMC 1450; ATCC-51988 *Mycobacterium lentiflavum* Springer et al. 89-446; ATCC-25922 (F50) *Escherichia coli* штамм № 240533; ATCC-6538 *Staphylococcus aureus* штамм № 201108; ATCC-9027 *Pseudomonas aeruginosa* штамм № 190155; ATCC-10702 *Bacillus cereus* штамм № 190155; № 6633 *Bacillus subtilis* штамм № 010011; *Salmonella typhimurium*371; *Salmonella enterica* Dublin 373; *Listeria monocytogenes* штамм АУФ.

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

3.1.3 Повторяемость и воспроизводимость

В ходе валидации набора реагентов для четырех видов амплификаторов, разных мест и времени анализа, а также различными операторами, была проведена оценка прецизионности в условиях

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

повторяемости и воспроизводимости. Повторяемость и воспроизводимость определения ДНК микобактерий были установлены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартных контрольных образцов с концентрациями 10 копий/мкл и 1 копия/мкл фрагментов ДНК МБТК или НТМБ, в качестве отрицательных образцов был использован реагент ddH_2O.

Повторяемость – степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование одним и тем же методом, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же комплекта оборудования в пределах короткого промежутка времени. Воспроизводимость – степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, с использованием различных комплектов оборудования, разных серий наборов реагентов.

Внутрипостановочная повторяемость результатов исследования контрольных образцов на выявление ДНК микобактерий набором реагентов на четырех видах амплификаторов составила 100%. Коэффициент вариации пороговых циклов амплификации 10-ти повторов каждого образца составил не более 2,67% (для двух серий). Межсерийная воспроизводимость результатов исследования контрольных образцов на выявление ДНК микобактерий набором реагентов на пяти видах амплификаторов составила 100%. Коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторов каждого образца составил не более 2,53%.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная повторяемость, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 Диагностические характеристики

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Клинические испытания МИ проведены в ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2).

В ходе клинических испытаний на образцах, содержащих и не содержащих ДНК микобактерий, доказана эффективность набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий, а также дифференциальной диагностики 12 видов нетуберкулезных микобактерий (*M.avium*, *M.intracellulare*, *M.xenopi*, *M.chimaera*, *M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.lentiflavum*, *M.paragordonae*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.malmoense*) в культуре микобактерий и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени и определены значения диагностических характеристик с доверительной вероятностью 95 % (таблица 2).

Чувствительность набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» при выявлении МБТК, *M.avium, M.intracellulare, M.xenopi, M.chimaera, M.kansasii, M.gordonae, M.lentiflavum, M.paragordonae, M.abscessus, M.chelonae, M.fortuitum, M.malmoense* составляет для каждого патогена не менее **91,24%** с доверительной вероятностью 95%.

Чувствительность набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» при выявлении НТМБ составляет не менее **99,29%** с доверительной вероятностью 95%.

Специфичность набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» при выявлении МБТК, *M.avium, M.intracellulare, M.xenopi, M.chimaera, M.kansasii, M.gordonae, M.lentiflavum, M.paragordonae, M.abscessus, M.chelonae, M.fortuitum, M.malmoense* составляет для каждого патогена не менее **99,33%** с доверительной вероятностью 95%.

Специфичность набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» при выявлении НТМБ составляет не менее **94,93%** с доверительной вероятностью 95%.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Доказана способность набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» выявлять смесь ДНК микобактерий.

Ингибирующего влияния эндогенных (гемоглобин 200 мкг/мл, муцин 5%) и экзогенных (АЦЦ (0,1 %), амброксол (1 %), бромгексин (0,5 %), беродуал (1 %) потенциально интерферирующих веществ на результат ПЦР-исследования набором реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» после выделения ДНК набором «Амплитуб-РВ» (комплект № 1) не обнаружено.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная повторяемость и межсерийная воспроизводимость. Внутрипостановочная повторяемость результатов исследования на выявление ДНК микобактерий набором реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» на всех использованных в испытаниях амплификаторах составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторностей каждого образца не более 1,42% (для двух испытанных серий). Межсерийная воспроизводимость результатов исследования на выявление ДНК микобактерий набором реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» на всех использованных в испытаниях амплификаторах составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторностей каждого образца не более 2,64%.

Таблица 2 – Диагностические характеристики набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация»

Искомый микроорганизм	Чувствительность (%) метода при выделении ДНК из			Специфичность (%) метода при выделении ДНК из		
	культур	диаг. мат-ла	суммарно	культур	диаг. мат-ла	суммарно
МБТК	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.intracellulare	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.xenopi	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.avium,	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.chimaera	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.kansasii	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.gordonae	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.lentiflavum	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.paragordonae	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.abscessus	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.chelonae	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.fortuitum	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
M.malmoense	83,89-100,00[1)]	83,89-100,00[1)]	91,24-100,00[2)]	98,60-100,00[5)]	98,74-100,00[6)]	99,33-100,00[7)]
НТМБ	98,60-100,00[3)]	98,60-100,00[3)]	99,29-100,00[4)]	83,89-100,00[8)]	93,12-100,00[9)]	94,93-100,00[10)]

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Примечание:
1) число заведомо положительных образцов - 20;
2) число заведомо-положительных образцов - 40;
3) число заведомо-положительных образцов - 270;
4) число заведомо-положительных образцов - 540;
5) число заведомо отрицательных образцов - 270;
6) число заведомо отрицательных образцов - 302;
7) число заведомо отрицательных образцов - 572;
8) число заведомо отрицательных образцов - 20;
9) число заведомо отрицательных образцов - 52;
10) число заведомо отрицательных образцов - 72

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н). Безопасность набора реагентов, включающее допустимость рисков, с учетом общепризнанного уровня техники для определения пригодности медицинского изделия в целях размещения его на рынке в соответствии с предусмотренным применением/предусмотренным назначением, регламентирована ГОСТ ISO 14971-2011.

Работу проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организаций и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», Приказа МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации», Приказа МЗ РФ № 951 от 29 декабря 2014 г. «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания». При работе необходимо всегда выполнять следующие

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

требования: рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

Исследования материала на наличие МБТК и НТМБ методом ПЦР-РВ проводят в учреждениях, имеющих разрешение на работу с возбудителями III-IV группы патогенности. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. п. 2.1 «Состав набора»). Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшего подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса;
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%;
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;
- Удалять и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке;
- Соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР-РВ с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах. Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое;
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;

— Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 15-30 мин;

— Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организаций и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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

— Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию;

— Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;

— Не использовать набор реагентов по истечении срока годности;

— Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

— Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Компоненты набора «Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-Р НТМБ-Дифф» и «Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы ДНК МБТК и НТМБ в стрипованных микропробирках, ПКО-МБТК-НТМБ» содержат азид натрия в концентрации, безопасной для пользователя.

— Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. Вреден при проглатывании. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно;

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

В состав компонентов набора «Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-Р НТМБ-Дифф» и «Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы ДНК МБТК и НТМБ в стрипованных микропробирках, ПКО-МБТК-НТМБ» входят следующие материалы животного происхождения – БСА и рекомбинантная Taq-полимераза, являющиеся биологически безопасными.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку входящие в состав изделия вещества (Taq-полимераза и БСА) являются биологически безопасными.

Применение изделия для диагностики ин витро «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» не создает прямого риска для пациента или обследуемого лица, так как его не используют наружно или внутренне (энтерально). При

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является безопасным. Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

— канцерогенный эффект отсутствует;

— мутагенное действие отсутствует;

— репродуктивная токсичность отсутствует.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 (либо их спектральным аналогам):

— «АНК-32 (32М)» (Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции «АНК» по ТУ 9443-003-04699534-2005, ИАП РАН, г. Санкт-Петербург; ФСР 2010/08892);

— CFX-96 (Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, «Био-Рад Лабораториез, Инк.» США, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, ФСЗ 2008/03399);

— DTprime (Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия; ФСР 2011/10229);

— QuantStudio5 (Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, "Лайф Текнолоджис

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Холдинге Пте. Лтд.", Сингапур, Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Singapore; РЗН 2019/8446).

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение (ПО), поставляемое производителем прибора:

— АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемое с приборами «АНК-32М»;
— Bio-Rad CFX Manager 3.1 и выше, поставляемое с прибором CFX-96;
— QuantStudio Design & Analysis Software v 1.4.3 и выше, поставляемое с прибором QuantStudio 5;
— RealTime_PCR v7.9.5.48 и выше, поставляемое с прибором DT.

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия, ФСР 2010/07114), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 2-20 мкл или 20-200 мкл, штатив для данных дозаторов.

5.4 Другое используемое оборудование

— Микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903», ФСР 2009/05969);
— микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901», РУ № РЗН 2014/1454);
— штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 и 2 мл (кат. № СТ-17, Синтол);
— штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, Синтол);
— холодильник/морозильник на 2-8 °С/минус 16-20 °С.

5.5 Лабораторная посуда

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

— Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;

— Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

— отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

— комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

При использовании набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» в качестве анализируемой пробы может быть любой образец ДНК, полученный экстракцией из любого клинического материала, предназначенного для анализа микобактерий туберкулеза и/или микобактериоза, деконтаминированных осадков, полученных в результате стандартных процедур пробоподготовки при микробиологических исследованиях (Приказ №109 Минздрава РФ от 21 марта 2003 г., приложение 11), образцов культур.

В соответствии с Приказом МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» клиническим материалом для исследований служит: мокрота и отделяемое верхних дыхательных путей (пробы со слизью), промывные воды бронхов (ПВБ), бронхо-альвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ), смыв с ротоглотки, биоптаты, пунктаты, операционный материал, промывные воды желудка, моча, плевральная жидкость, спинномозговая жидкость, перикардиальная жидкость, синовиальная жидкость, асцитическая жидкость, раневое отделяемое, отделяемое половых путей, менструальная кровь, кровь из вены, кал, секционный материал, парафинизированный материал.

Перед процедурой экстракции ДНК клинические образцы должны пройти предварительную обработку в соответствии со стандартными процедурами пробоподготовки для микробиологических исследований при

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

выявлении, диагностике и лечении туберкулеза или с помощью специальных реагентов, предназначенных для обработки клинических образцов для анализа МБТК молекулярно-генетическими методами (например, «Амплитуб-Преп», ООО «НПФ Синтол», РЗН 2017/6634).

6.1 Условия хранения анализируемых проб (образцов ДНК)

Раствор ДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°С в течение года.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ состоит из следующих этапов:

— проведение ПЦР-РВ;

— анализ и интерпретация результатов.

7.1 Подготовка и проведение ПЦР-РВ

ПЦР-РВ проводят в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

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

На всех этапах проведения ПЦР-РВ необходимо использовать наконечники с аэрозольным барьером!!!

1. Расход реагентов на одно определение и каждый анализ рассчитывают согласно таблице 3.

Таблица 3 – Расход реагентов набора «Амплитуб-НТМБ-дифференциация»

Реагент	**Расход реагентов**	
	на 1 определение	на каждый анализ
Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, **РС-Р НТМБ-Дифф**	1 стрип (4 микропробирки)	**N + 1** стрипов, где **N** – количество исследуемых образцов; **1** – ОКО
Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы ДНК МБТК и НТМБ в стрипованных микропробирках, **ПКО-МБТК-НТМБ**	-	1 контрольный стрип
ddH_2O	-	4 х 20 мкл (1 стрип)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В каждую постановку обязательно включают 1 контрольный стрип **ПКО-МБТК-НТМБ** и 1 стрип с отрицательными контрольными образцами **ОКО**. Для **ОКО** используют стрипы для исследуемых образцов с **РС-Р НТМБ-Дифф,** в которые добавляют **ddH_2O** в качестве образца.

Примечание. Общее количество пробирок не должно превышать размер реакционного модуля используемого амплификатора. Например, максимальная загрузка для 96-луночного прибора составляет 24 стрипа (22 образца + 1 ПКО + 1 ОКО), для 48-луночного прибора – 12 стрипов (10 образцов + 1 ПКО + 1 ОКО), для 32-луночного прибора – 8 стрипов (6 образцов + 1 ПКО + 1 ОКО).

2. **Исследуемые образцы** (при необходимости) размораживают, перемешивают на микроцентрифуге-вортексе.

3. Набор реагентов с необходимым количеством стрипов с **РС-Р НТМБ-Дифф (для образцов и ОКО)** и **ПКО-МБТК-НТМБ** извлекают из холодильника, и центрифугируют 3-5 секунд для сброса капель при 3000 об/мин на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл. **ddH_2O** размораживают и центрифугируют на микроцентрифуге-вортексе.

4. Устанавливают стрипы в штатив в соответствии с маркировкой **1-ой пробирки** и обозначают в соответствии с протоколом исследования.

ВНИМАНИЕ! Не допускать размораживания и повторного замораживания оставшихся пробирок со смесью!

5. Вносят по **20 мкл ddH_2O** в каждую пробирку отрицательного контрольного стрипа (на стенку пробирки) с реакционной смесью **РС-Р НТМБ-Дифф**, начиная с 1-й промаркированной пробирки. Плотно закрывают крышки.

6. Вносят исследуемые образцы в стрипы с реакционной смесью для исследуемых образцов **РС-Р НТМБ-Дифф** из расчета **1 стрип – 1 образец**. Один исследуемый образец вносится в каждую пробирку стрипа (на

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

стенку пробирки) по **20 мкл,** начиная с 1-й промаркированной пробирки. Плотно закрывают крышки.

7. Вносят в микропробирки **контрольного стрипа ПКО-МБТК-НТМБ** (на стенку каждой пробирки) по **20 мкл ddH_2O**, плотно закрывают крышки.

Примечание. После смешивания реакционной смеси и препарата ДНК микропробирки могут храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 30 мин. перед установкой в амплификатор.

8. Перемешивают содержимое микропробирок на микроцентрифуге-вортексе.

9. Центрифугируют 30 секунд при 3000 об/мин. на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл.

10. Помещают микропробирки в прибор для ПЦР-РВ в соответствии с рекомендуемым порядком установки в прибор (рис.1) и прикатывают крышки микропробирок.

ПКО	**ОКО**	1	2	3	4	5	6
ПКО	**ОКО**	1	2	3	4	5	6
ПКО	**ОКО**	1	2	3	4	5	6
ПКО	**ОКО**	1	2	3	4	5	6

АНК-32

1	1	1	1	2	2	2	2
3	3	3	3	4	4	4	4
5	5	5	5	6	6	6	6
7	7	7	7	8	8	8	8
9	9	9	9	10	10	10	10
ПКО	**ПКО**	**ПКО**	**ПКО**	**ОКО**	**ОКО**	**ОКО**	**ОКО**

DTlite

ПКО	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
ПКО	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
ПКО	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
ПКО	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
ОКО	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
ОКО	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
ОКО	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
ОКО	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22

CFX-96, DTprime, QS5

Рисунок 1. Пример расположения стрипованных микропробирок в амплификаторах: ПКО, ОКО – контрольные стрипы; 1, 2, 3… – стрипы с образцами.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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

11. Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации и программируют амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно таблице 4.

Таблица 4 – Температурно-временной режим амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

№ п/п	Температурно-временной режим	Регистрация сигнала	Число циклов
1	95 °С – 120 секунд	-	1
2	95 °С – 15 секунд	-	45
3	63 °С – 40 секунд	FAM, R6G/HEX/VIC ROX, Cy5, Cy5.5	

12. По окончании выполнения программы приступают к анализу и интерпретации результатов.

7.2 Анализ и интерпретация результатов

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

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО приборов для ПЦР-РВ (см. п.5.1 настоящей инструкции), с помощью приведенного ниже алгоритма или электронной таблицы (файл-шаблон), предоставляемой по запросу пользователя.

Работу с ПО осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (рис. 2-3), что определяет

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла Ct в соответствующей графе таблицы результатов в ПО приборов. Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции означает любую величину порогового цикла Ct меньше 45. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается ПО прибора, например, как предельная величина порогового цикла (Ct ≥ 45 в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (N/A в приборах CFX, Undetermined в приборах QuantStudio) и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Интерпретацию результатов проводят последовательно для каждой пробирки стрипа, начиная с первой пробирки.

Первая пробирка стрипа предназначена для выявления ДНК МБТК и/или НТМБ. Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции только по каналу FAM или одновременно по каналам FAM и R6G/HEX/VIC в 1 пробирке свидетельствует о наличии специфических фрагментов ДНК МБТК в данной пробирке. Значение порогового цикла Ct для каналов FAM и R6G/HEX/VIC при этом может быть любым (рис.2).

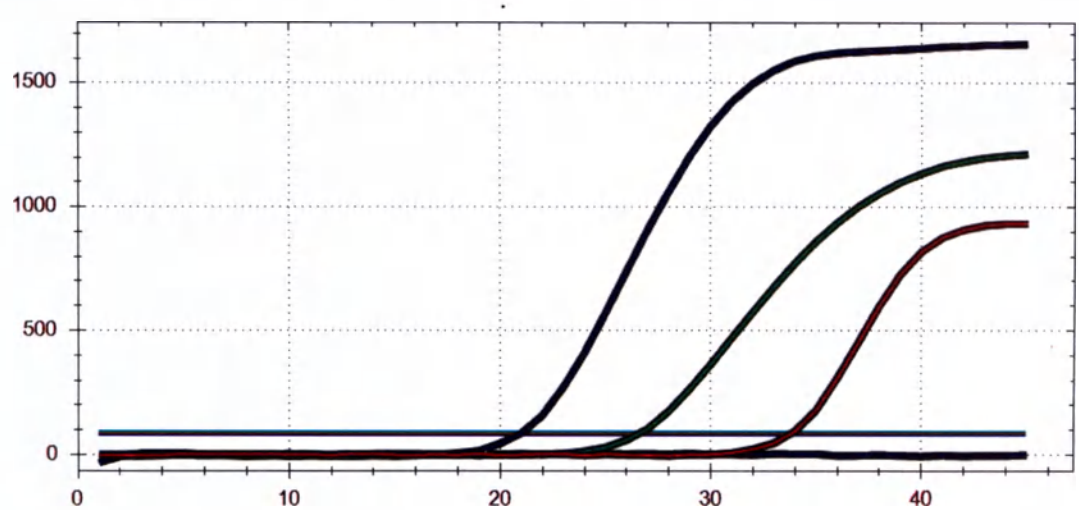


Рисунок 2 – Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции в 1-ой пробирке – положительный результат на наличие МБТК (CFX-96)
FAM – HEX – Cy5.5 –

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу ROX в 1-ой пробирке свидетельствует о наличии специфических фрагментов ДНК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

НТМБ. Значение порогового цикла для канала ROX должно быть не более 37 (рис.3).

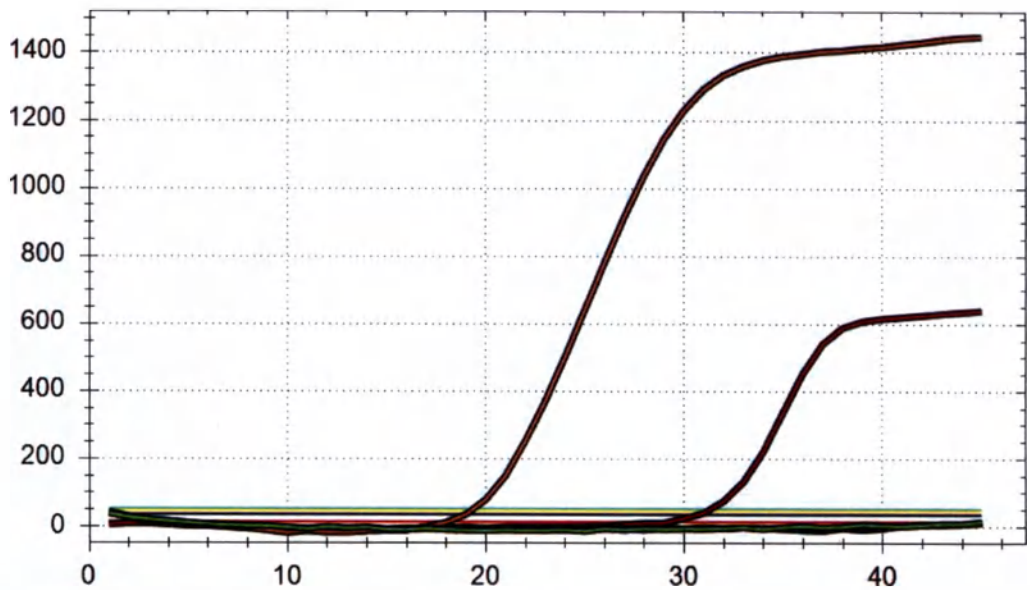


Рисунок 3 – Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции в 1-ой пробирке – положительный результат на наличие НТМБ (CFX-96)
ROX – Cy5.5 –

2÷4 пробирки стрипа предназначены для выявления клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий. Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналам FAM и/или R6G/HEX/VIC, и/или ROX, и/или Cy5 во 2÷4 пробирках свидетельствует о наличии ДНК соответствующего вида НТМБ. При этом разница (ΔCt) между значением порогового цикла, полученного во 2÷4 пробирках стрипа для каналов FAM (Ct_{FAM}) или R6G/HEX/VIC ($Ct_{R6G/HEX/VIC}$) или ROX (Ct_{ROX}) или Cy5 (Ct_{Cy5}), и значением порогового цикла, полученного в 1-ой пробирке по каналу ROX (Ct_{ROX}) для данного образца должна быть **не более 5** (рис. 4-5) – $\mathbf{\Delta Ct=|Ct_{вид} - Ct_{ROX1\ пр.}| \leq 5}$.

При обнаружении в образце ДНК НТМБ в 1-ой пробирке, но не обнаружении никакого вида НТМБ во 2÷4-ой пробирках или, если разница пороговых циклов (ΔCt) между значением порогового цикла, полученного в 1-ой пробирке по каналу ROX (Ct_{ROX}) и значением порогового цикла, полученного во 2÷4 пробирках стрипа для каналов FAM (Ct_{FAM}) или

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

R6G/HEX/VIC ($Ct_{R6G/HEX/VIC}$) или ROX (Ct_{ROX}) или Cy5 (Ct_{Cy5}), **больше 5 – $\Delta Ct=|Ct_{вид}–Ct_{ROX1пр.}|>5$,** делается вывод, что ДНК НТМБ обнаружена, вид не входит в перечень видов, определяемых данным набором (*Mycobacterium spp.*) (рис. 6). Для определения вида необходимо использовать другой метод, например, секвенирование.

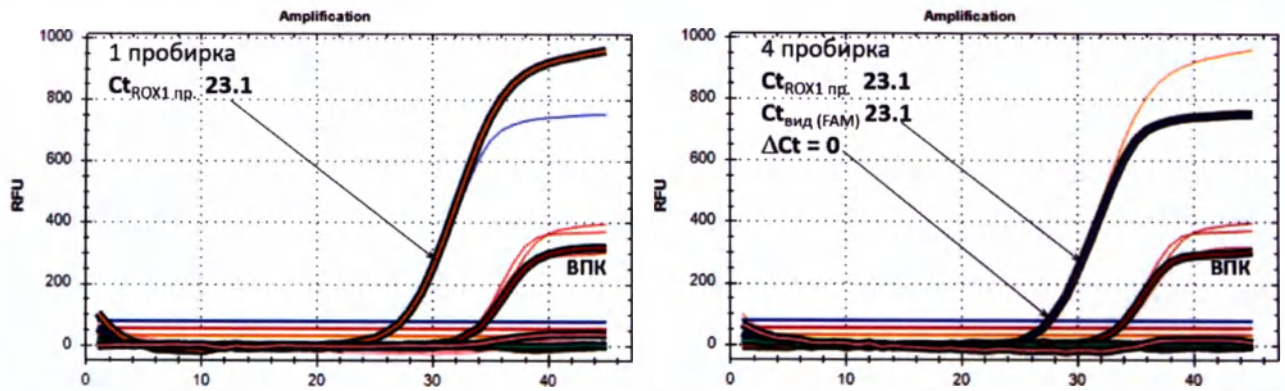


Рисунок 4 – Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции для образца в 1-ой и 2-ой пробирках (CFX-96) – определение вида НТМБ *M.abscessus*

$\Delta Ct=|Ct_{вид} - Ct_{ROX1\ пр.}| = |20{,}85 - 20{,}80| = 0{,}05 < 5$

FAM – ROX – Cy5.5 –

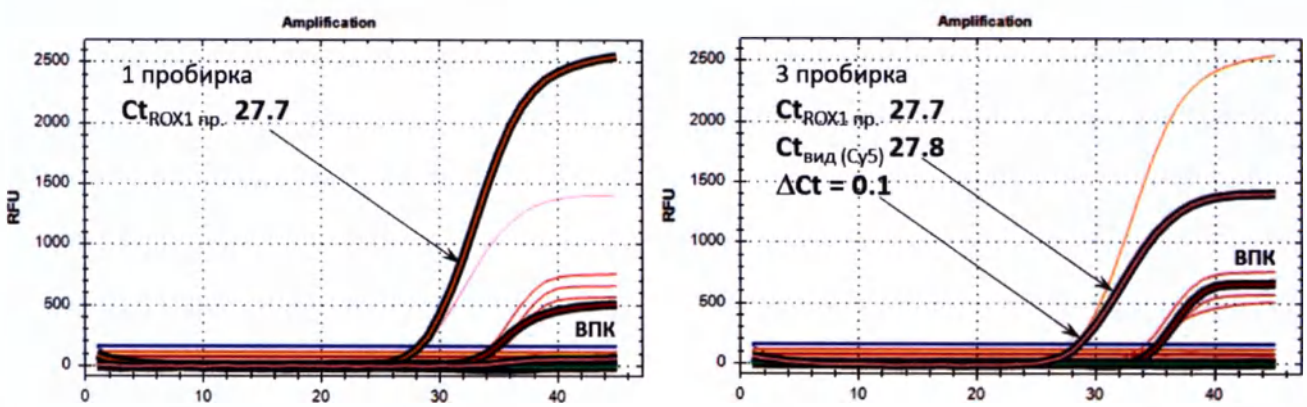


Рисунок 5 – Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции для образца в 1-ой и 3-ей пробирках (CFX-96) – определение вида НТМБ *M. paragordonae*

$\Delta Ct=|Ct_{вид} - Ct_{ROX1\ пр.}| = |27{,}8 - 27{,}7| = 0{,}1 < 5$

ROX – Cy5.5 – Cy5 –

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

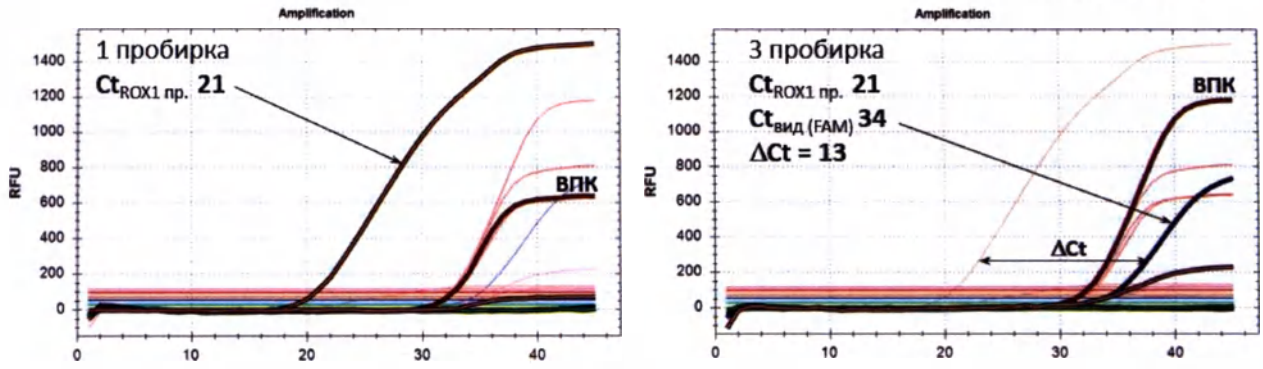


Рисунок 6 – Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции для образца в 1-ой и 2-ой пробирках (CFX-96): обнаружение *Mycobacterium spp.*, вид НТМБ *M.kansasii* не учитывается

$\Delta Ct = |Ct_{вид} - Ct_{ROX1\ пр.}| = |34{,}0 - 21{,}0| = 13 > 5$

FAM – ROX – Cy5.5 –

Для исключения ложноотрицательного результата при проведении ПЦР-РВ используют ВПК, который содержится в каждой пробирке с реакционной смесью набора реагентов и детектируется по каналу Cy5.5. Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу Cy5.5 в 1÷4 пробирках в случае отсутствия кинетических кривых роста флуоресценции по каналам FAM, R6G/HEX/VIC, ROX, Cy5 свидетельствует об успешном прохождении реакции ПЦР-РВ и отсутствии ингибирования, а также подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК МБТК и НТМБ в данной микропробирке.

Интерпретацию результатов анализа **контролей** проводят согласно таблице 5.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 5 – Интерпретация результатов анализа **контролей** с использованием набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация»

<table>
<tr><th rowspan="2">Образец</th><th rowspan="2">Пробирка стрипа</th><th colspan="5">Результат ПЦР (значение порогового цикла Ct) по каналу флуорофора</th><th rowspan="2">Интерпретация результата</th></tr>
<tr><th>FAM</th><th>R6G/HEX/ VIC</th><th>ROX</th><th>Cy5</th><th>Cy5.5</th></tr>
<tr><td colspan="8">Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев</td></tr>
<tr><td>ПКО</td><td>Любая из 4-х</td><td colspan="4">–/+[1] Ct> 35
по любому из каналов</td><td>любой[2]</td><td>Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ</td></tr>
<tr><td rowspan="6">ОКО</td><td rowspan="3">1</td><td>–[3]</td><td>–</td><td>–/+ Ct >37</td><td></td><td>–/+ Ct >35</td><td>Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ</td></tr>
<tr><td>+</td><td>любой</td><td>любой</td><td></td><td rowspan="2">любой</td></tr>
<tr><td>–</td><td>любой</td><td>+ Ct ≤ 37</td><td></td></tr>
<tr><td>–</td><td>+</td><td>–/+ Ct >37</td><td></td><td>любой</td></tr>
<tr><td>2</td><td colspan="4" rowspan="3">В любой пробирке по любому из каналов +</td><td rowspan="3">любой</td></tr>
<tr><td>3</td></tr>
<tr><td>4</td></tr>
<tr><td colspan="8">Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов</td></tr>
<tr><td>ПКО</td><td>Любая из 4-х</td><td colspan="4">+ Ct ≤ 35</td><td>любой</td><td>Набор реагентов специфичен в отношении ДНК МБТК и НТМБ</td></tr>
<tr><td rowspan="4">ОКО</td><td>1</td><td>–</td><td>–</td><td>–/+ Ct >37</td><td></td><td>+ Ct ≤ 35</td><td rowspan="4">Контаминация отсутствует, ингибирование отсутствует</td></tr>
<tr><td>2</td><td colspan="3" rowspan="3">–</td><td rowspan="3">+ Ct ≤ 35</td></tr>
<tr><td>3</td></tr>
<tr><td>4</td></tr>
</table>

Интерпретацию результатов анализа **исследуемых образцов** проводят согласно таблице 6. Для каждого образца интерпретируют результат во всех пробирках, начиная с 1-ой. **Общий результат по образцу складывается из результата по каждой пробирке и является достоверным ТОЛЬКО в случае получения достоверного результата в каждой из 4-х пробирок стрипа. К НЕДОСТОВЕРНОМУ результату относится ложноотрицательный или ложноположительный или недостоверный результат.**

[1] «–/+» значение порогового цикла отсутствует либо определено как…
[2] величина порогового цикла не имеет значения
[3] «–» значение порогового цикла отсутствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 6 – Интерпретация результатов анализа **исследуемых образцов** с использованием набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация»

Пробирка стрипа	Результат ПЦР (значение порогового цикла Ct) по каналу флуорофора…					Условие	Интерпретация результата
	FAM	R6G/HEX/ VIC	ROX	Cy5	Cy5.5	$\Delta Ct = \lvert Ct_{вид} - Ct_{ROX1\ пр.} \rvert$	
1	ДНК МБТК	ДНК МБТК	ДНК НТМБ		ВПК		
2÷4	ДНК НТМБ	ДНК НТМБ	ДНК НТМБ	ДНК НТМБ	ВПК		
1	+	любой	−/+ Ct>37		любой		Обнаружена ДНК МБТК. ДНК НТМБ не обнаружена.
	+	любой	+ Ct ≤ 37		любой		Обнаружены ДНК МБТК и ДНК НТМБ.
	–	любой	+ Ct ≤ 37		любой		Обнаружена ДНК НТМБ. ДНК МБТК не обнаружена.
	–	–	−/+ Ct>37		+ Ct≤35		ДНК МБТК и ДНК НТМБ не обнаружены.
	–	–	−/+ Ct>37		−/+ Ct>35		Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
	–	+	−/+ Ct>37		любой		Ложноположительный результат
2	+	–	–	–	любой	$\Delta Ct \leq 5$	НТМБ вида *M.intracellulare*
	–	+	–	–			НТМБ вида *M.avium*
	–	–	+	–			НТМБ вида *M.xenopi*
	–	–	–	+			НТМБ *M.chimaera*
	+	–	–	–	любой	$\Delta Ct > 5$ $Ct_{вид} > Ct_{ROX1\ пр.}$	Целевой вид НТМБ не определен
	–	+	–	–			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	+	–			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	–	+			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	–	–	+ Ct≤35		Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.
	–	–	–	–	−/+ Ct>35		Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
	+	–	–	–	любой	$\Delta Ct > 5$ $Ct_{вид} < Ct_{ROX1\ пр.}$ или	Недостоверный результат
	–	+	–	–			Недостоверный результат

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

	–	–	+	–		$Ct_{ROX1\ пр.}$ отсутствует	Недостоверный результат
	–	–	–	+			Недостоверный результат
3	+	–	–	–	любой	ΔCt≤5	НТМБ вида *M.kansasii*
	–	+	–	–			НТМБ вида *M.lentiflavum*
	–	–	+	–			НТМБ вида *M.gordonae*
	–	–	–	+			НТМБ вида *M.paragordonae*
	+	–	–	–	любой	ΔCt>5 $Ct_{вид}$> $Ct_{ROX1\ пр.}$	Целевой вид НТМБ не определен
	–	+	–	–			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	+	–			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	–	+			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	–	–	+ Ct≤35		Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.
	–	–	–	–	–/+ Ct>35		Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
	+	–	–	–	любой	ΔCt>5 $Ct_{вид}$< $Ct_{ROX1\ пр.}$ или $Ct_{ROX1\ пр.}$ отсутствует	Недостоверный результат
	–	+	–	–			Недостоверный результат
	–	–	+	–			Недостоверный результат
	–	–	–	+			Недостоверный результат
4	+	–	–	–	любой	ΔCt≤ 5	НТМБ вида *M.abscessus*
	–	+	–	–			НТМБ вида *M.fortuitum*
	–	–	+	–			НТМБ вида *M.chelonae*
	–	–	–	+			НТМБ вида *M.malmoense*
	+	–	–	–	любой	ΔCt>5 $Ct_{вид}$> $Ct_{ROX1\ пр.}$	Целевой вид НТМБ не определен
	–	+	–	–			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	+	–			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	–	+			Целевой вид НТМБ не определен
	–	–	–	–	+ Ct≤35		Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.
	–	–	–	–	–/+ Ct>35		Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
	+	–	–	–	любой	ΔCt>5	Недостоверный результат

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

	–	+	–	–		$Ct_{вид} < Ct_{ROX1\ пр.}$ или $Ct_{ROX1\ пр.}$ отсутствует	Недостоверный результат
	–	–	+	–			Недостоверный результат
	–	–	–	+			Недостоверный результат

При одновременном обнаружении какого-либо вида НТМБ и получении для исследуемого образца **недостоверного результата в 1-ой пробирке** (ложноположительного, ложноотрицательного или, когда значение порогового цикла в 1-ой пробирке по каналу ROX отсутствует или превышает значение (я) порогового цикла, полученного в любой из 2÷4-ой пробирок по каналам FAM, R6G/HEX/VIC, ROX, Cy5, более чем на 5) результат исследования признается **полностью недостоверным**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.2.1 Интерпретация результата в случаях выявления нескольких видов микобактерий

В небольшом числе случаев в образце может быть выявлено несколько видов микобактерий. **В случае выявления смеси двух или более видов НТМБ в одном образце рекомендуется исследовать несколько образцов от данного пациента, как клинического диагностического материала, так и образцов культур при их наличии.**

1. Смесь МБТК и НТМБ

В случае обнаружения МБТК и НТМБ одновременно будет регистрироваться положительный сигнал по каналам FAM и ROX в 1-ой пробирке (табл. 6). При этом если во 2÷4 пробирке также будет регистрироваться положительный сигнал по каналу, соответствующему виду НТМБ, результат интерпретируется как наличие в образце ДНК МБТК и определенного вида НТМБ. Если во 2÷4 пробирке не будет регистрироваться положительный сигнал по каналу, соответствующему виду НТМБ, или если разница пороговых циклов между общим фрагментом НТМБ и конкретным видом $\Delta Ct=|Ct_{вид}-Ct_{ROX1пр.}|>5$, результат интерпретируется как наличие в образце ДНК МБТК и ДНК НТМБ, вид которой не определен (*Mycobacterium spp.*).

2. Смесь нескольких видов НТМБ

При обнаружении нескольких видов НТМБ во 2÷4 пробирках **интерпретация для каждого из них проводится** в соответствии с таблицей 5 **с учетом ΔCt** – разницы пороговых циклов между значением порогового цикла, полученного в 1-ой пробирке по каналу ROX (Ct_{ROX}) для данного образца, и значениями пороговых циклов, полученных во 2÷4 пробирках, по каналам, соответствующим видам НТМБ.

В случае, когда несколько видов в одном образце содержатся

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

примерно в равных долях (**$\Delta Ct=|Ct_{вид1}-Ct_{ROX1пр.}|\leq 5$; $\Delta Ct=|Ct_{вид2}-Ct_{ROX1пр.}|\leq 5$),** то делается вывод **о смеси соответствующих видов НТМБ** (рис. 8).

В случае, когда один вид НТМБ доминирует в образце (**$\Delta Ct=|Ct_{вид1}-Ct_{ROX1пр.}|\leq 5$**), а другой(-ие) вид(-ы) являются минорным(-и) (для которых **$\Delta Ct=|Ct_{вид2}-Ct_{ROX1\ пр.}|>5$**), то однозначно подтвержденным можно считать наличие в образце доминирующего вида, наличие минорных видов следует подтвердить дополнительно, исследовав образец культуры, полученной из данного материала или еще один образец клинического диагностического материала от пациента (рис. 7).

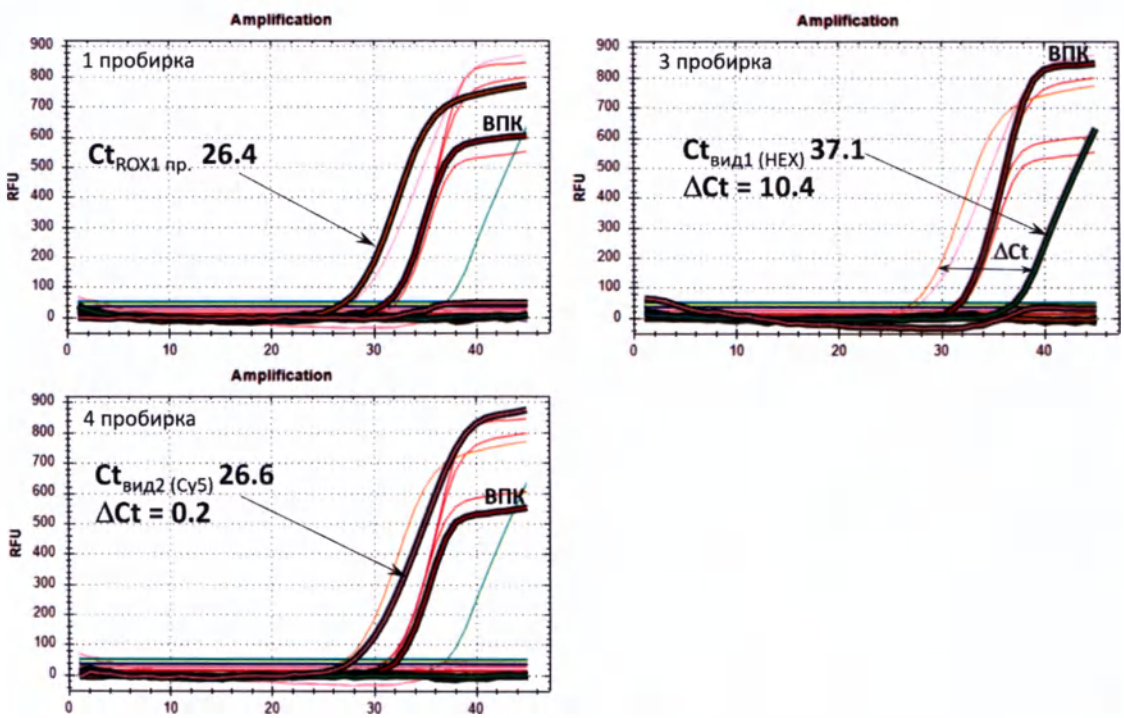


Рисунок 7 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции для образца в 1-ой, 3-ей и 4-ой пробирках (CFX-96): обнаружение вида НТМБ – *M.malmoense* (НТМБ 1), *M.lentiflavum* (НТМБ 2) не учитывается

$\Delta Ct_{НТМБ1}=|Ct_{вид1}-Ct_{ROX1\ пр.}| = |26.6-26.4| = 0.2 \leq 5$

$\Delta Ct_{НТМБ2}=|Ct_{вид2}-Ct_{ROX1\ пр.}| = |37.1-26.4| = 10.4 > 5$

HEX– ROX– Cy5– Cy5.5–

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

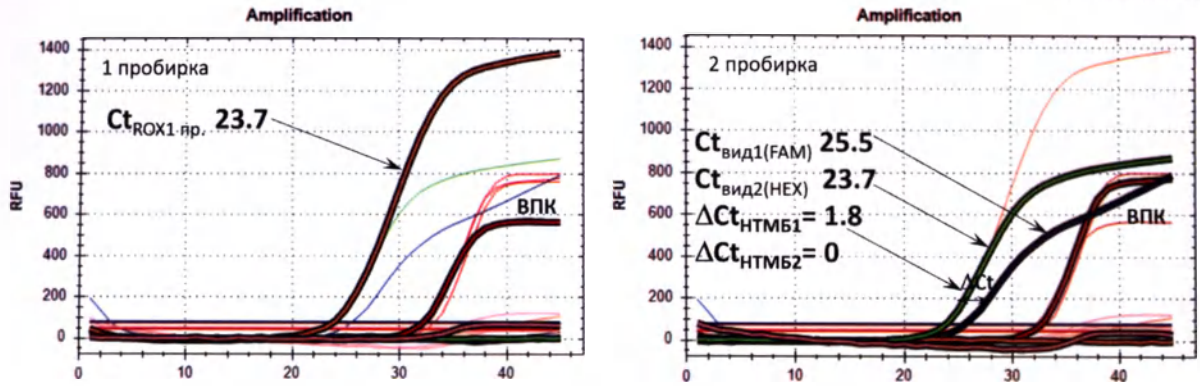


Рисунок 8 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции для образца в 1-ой и 2-ой пробирках (CFX-96): обнаружение смеси двух видов НТМБ – *M.intracellulare* (НТМБ 1) и *M.avium* (НТМБ 2)

$$\Delta Ct_{НТМБ1} = |Ct_{вид1} - Ct_{ROX1\ пр.}| = |25.5 - 23.7| = 1.8 \leq 5$$

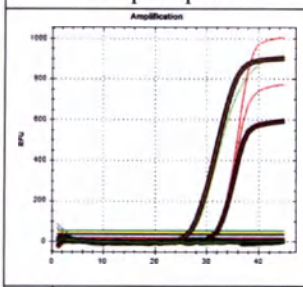
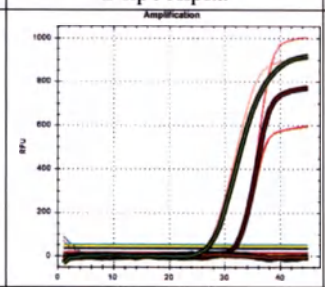
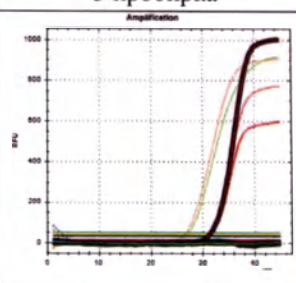
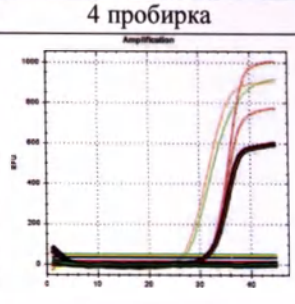
$$\Delta Ct_{НТМБ2} = |Ct_{вид2} - Ct_{ROX1\ пр.}| = |23.7 - 23.7| = 0 \leq 5$$

FAM – ROX – HEX – Cy5.5 –

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

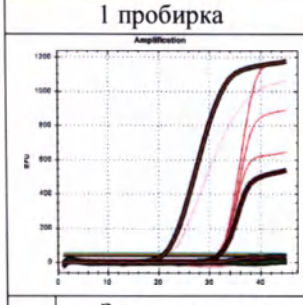
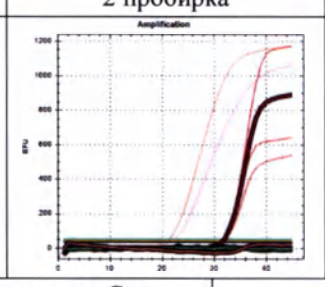
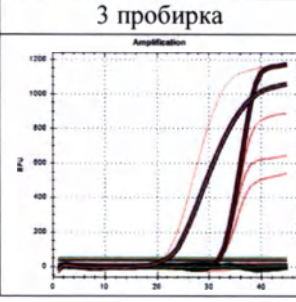
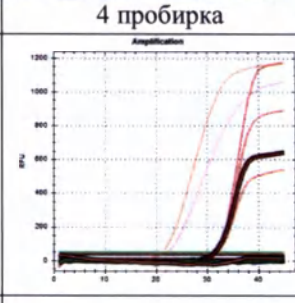
7.2.2 Примеры интерпретации результатов анализа

Образец 1

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	-	-	**26.3**		30.2	Обнаружена ДНК НТМБ. ДНК МБТК не обнаружена.	Обнаружена ДНК НТМБ вида *M.avium*. ДНК МБТК не обнаружена.
2	-	**27.3**	-	-	30.3	НТМБ вида *M.avium* $\Delta Ct_{НТМБ}=\lvert Ct_{вид}-Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 27.3-26.3\rvert = 1.0 \leq 5$	
3	-	-	-	-	29.8	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
4	-	-	-	-	29.3	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

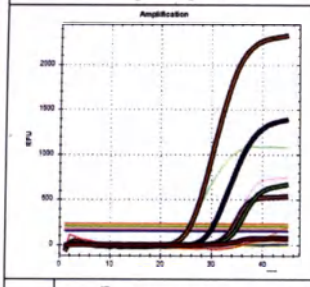
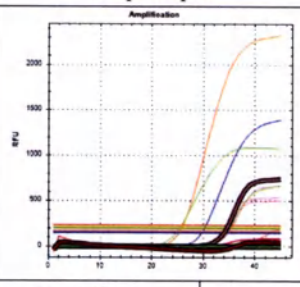
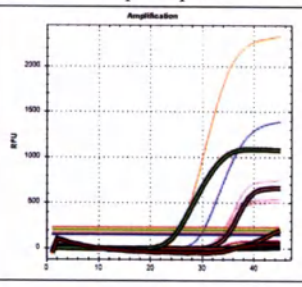
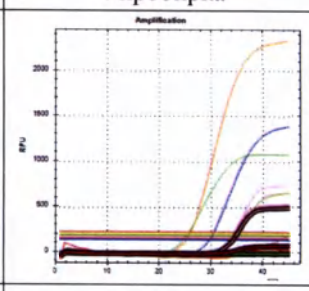
Образец 2

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	-	-	**20.6**		29.9	Обнаружена ДНК НТМБ. ДНК МБТК не обнаружена.	Обнаружена ДНК НТМБ вида *M.paragordonae*. ДНК МБТК не обнаружена.
2	-	-	-	-	30.1	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
3	-	-	-	**21.5**	31.1	НТМБ вида *M.paragordonae* $\Delta Ct_{НТМБ}=\lvert Ct_{вид}-Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 21.5-20.6\rvert = 0.9 \leq 5$	
4	-	-	-	-	29.3	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

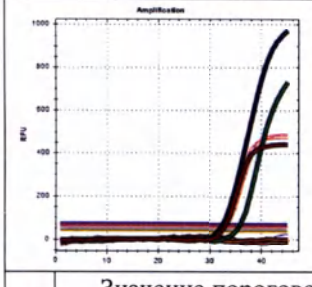
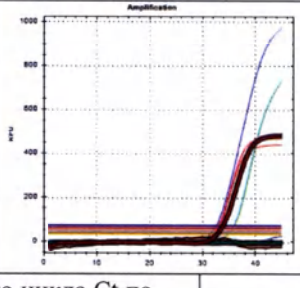
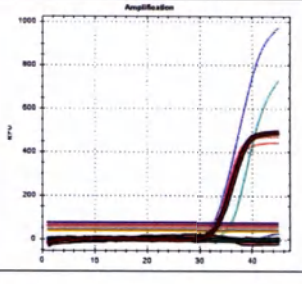
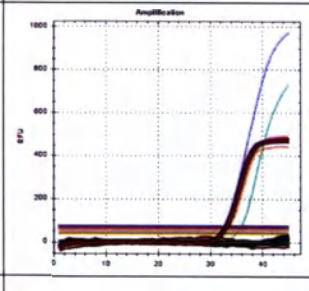
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Образец 3

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	**29.6**	**35.0**	**26.0**		33.8	Обнаружены ДНК МБТК и ДНК НТМБ.	Обнаружены ДНК МБТК и ДНК НТМБ вида *M.lentiflavum.*
2	-	-	-	-	34.1	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
3	-	**25.3**	-	-	35.0	НТМБ вида *M.lentiflavum* $\Delta Ct_{НТМБ}=\lvert Ct_{вид} - Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 25.3 - 26.0\rvert = 0.7 \leq 5$	
4	-	-	-	-	34.3	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

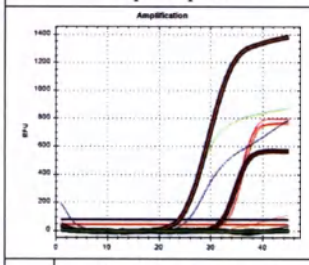
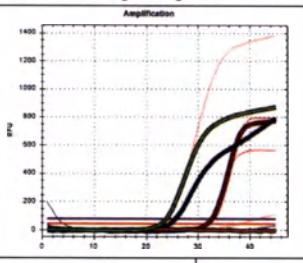
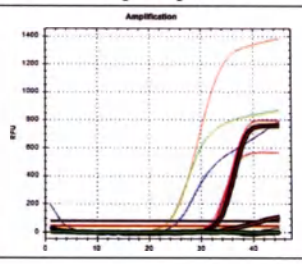
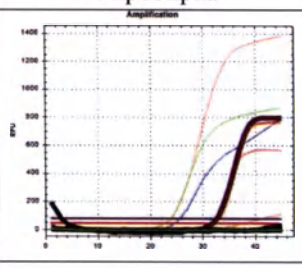
Образец 4

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	**32.5**	**35.1**	-		32.9	Обнаружена ДНК МБТК. ДНК НТМБ не обнаружена.	Обнаружена ДНК МБТК. ДНК НТМБ не обнаружена.
2	-	-	-	-	33.5	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
3	-	-	-	-	33.2	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
4	-	-	-	-	32.7	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

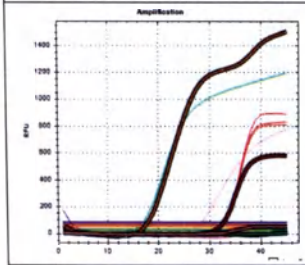
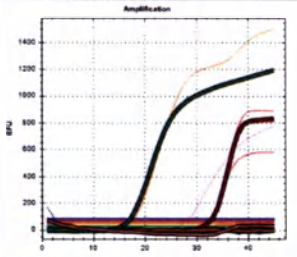
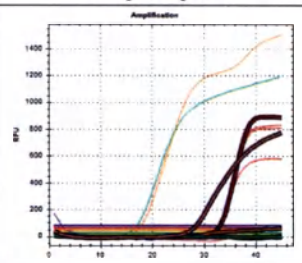
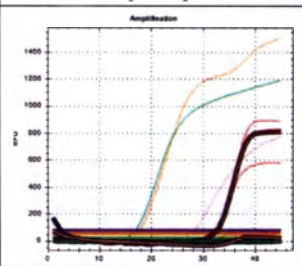
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Образец 5

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	-	-	**23.7**		31.3	Обнаружена ДНК НТМБ. ДНК МБТК не обнаружена.	Обнаружена ДНК НТМБ смеси видов *M.intracellulare* и *M.avium*. ДНК МБТК не обнаружена.
2	**25.5**	**23.7**	-	-	31.7	НТМБ вида *M.intracellulare*. НТМБ вида *M.avium*. $\Delta Ct_{НТМБ1}=\lvert Ct_{вид1} - Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 25.5 - 23.7\rvert = 1.8 \leq 5$ $\Delta Ct_{НТМБ2}=\lvert Ct_{вид2} - Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 23.7 - 23.7\rvert = 0 \leq 5$	
3	-	-	-	-	32.3	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
4	-	-	-	-	31.7	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

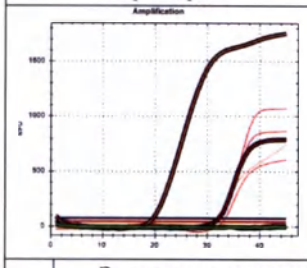
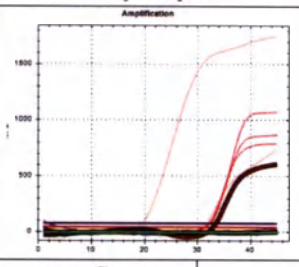
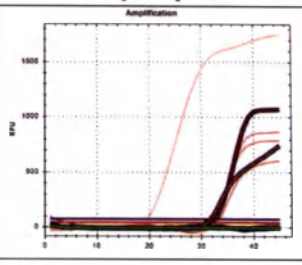
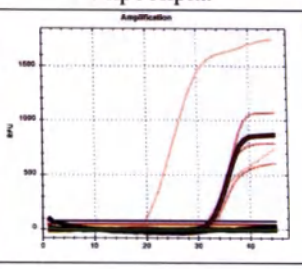
Образец 6

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	-	-	**17.1**		32.2	Обнаружена ДНК НТМБ. ДНК МБТК не обнаружена.	Обнаружена ДНК НТМБ вида *M.avium*.. ДНК МБТК не обнаружена.
2	**15.2**	-	-	-	32.3	НТМБ вида *M.avium*. $\Delta Ct_{НТМБ1}=\lvert Ct_{вид1} - Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 15.2 - 17.1\rvert = 1.9 \leq 5$	
3	-	-	-	**23.4**	32.6	Целевой вид НТМБ не определен. $\Delta Ct_{НТМБ2}=\lvert Ct_{вид2} - Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 23.4 - 17.1\rvert = 6.3 \geq 5$	
4	-	-	-	-	32.1	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

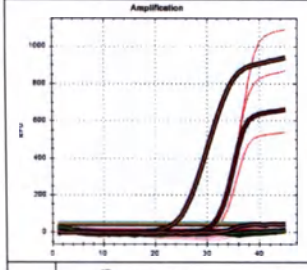
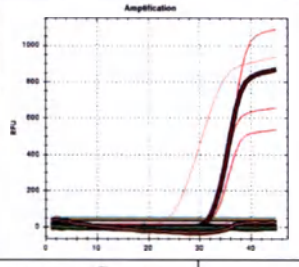
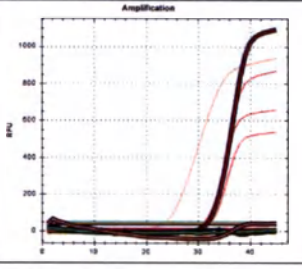
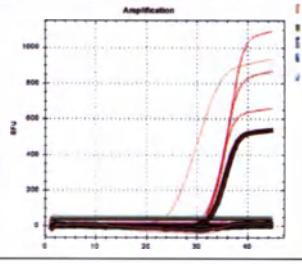
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Образец 7

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	-	-	**19.5**		31.2	Обнаружена ДНК НТМБ. ДНК МБТК не обнаружена.	Обнаружена ДНК НТМБ. Целевой вид НТМБ не определен. ДНК МБТК не обнаружена.
2	-	-	-	-	32.8	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
3	-	-	**31.5**	-	31.4	Целевой вид НТМБ не определен. $\Delta Ct_{НТМБ}=\lvert Ct_{вид}-Ct_{ROX1\ пр.}\rvert =$ $=\lvert 31.5-19.5\rvert = 12 \geq 5$	
4	-	-	-	-	31.5	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

Образец 8

1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка	4 пробирка
			

№ пр	Значение порогового цикла Ct по каналу…					Интерпретация результата	Итоговый вывод
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5		
1	-	-	**23.0**		29.2	Обнаружена ДНК НТМБ. ДНК МБТК не обнаружена.	Обнаружена ДНК НТМБ. Целевой вид НТМБ не определен. ДНК МБТК не обнаружена.
2	-	-	-	-	30.2	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
3	-	-	-	-	30.2	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	
4	-	-	-	-	30.6	Специфические фрагменты ДНК видов НТМБ не обнаружены.	

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3 Возможные ошибки

Таблица 7 – Возможные ошибки и действия при возникновении и исправлении возникающих ошибок анализа.

№	Возможная ошибка	Действие
1	Для положительного контроля ПЦР-РВ (ПКО-МБТК-НТМБ) значение порогового цикла Ct по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 5) отсутствует или превышает 35.	Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК. Возможная причина – ошибка при подготовке к реакции ПЦР-РВ (перепутаны стрипы с реакционной смесью, содержащей ПКО-МБТК-НТМБ и стрипы для исследуемых образцов с РС-Р НТМБ-Дифф.
2	Для отрицательного контроля ПЦР-РВ (ОКО) при любом из следующих вариантов:	
	—в 1-ой пробирке по любому из каналов FAM, HEX значение порогового цикла Ct не превышает 45 и/или по каналу ROX значение порогового цикла Ct не превышает 35.	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов в ходе постановки ПЦР-РВ. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
	—Во 2÷4-ой пробирках по любому из каналов для флуорофоров FAM, R6G/HEX/VIC, ROX, Cy5.5 значение порогового цикла Ct не превышает 35.	
3	Для исследуемого образца значение порогового цикла в 1-ой пробирке по каналу ROX отсутствует или превышает значение (я) порогового цикла, полученного в любой из 2÷4-ой пробирок по каналам FAM, R6G/HEX/VIC, ROX, Cy5, более чем на 5.	Недостоверный результат. Необходимо повторить амплификацию и детекцию исследуемого образца. При получении аналогичного результата рекомендуется обратиться к производителю набора.
4	Для исследуемого образца, в котором не обнаружена	Недостоверный (ложноотрицательный) результат,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

	специфическая ДНК, значение порогового цикла Ct по каналу Cy5.5 отсутствует или превышает 35.	ингибирование ПЦР-РВ. Необходимо повторить ПЦР-исследование заингибированного исследуемого образца, начиная с этапа выделения ДНК.
5	Для исследуемого образца определено значение порогового цикла по указанным каналам, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1 Условия хранения набора

Набор реагентов хранить при температуре от минус 16 до минус 20 °С в условиях естественной влажности и защиты от света (морозильная камера). Суммарный срок хранения при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не должен превышать 5 суток в течение срока годности набора реагентов.

8.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от минус 16 до минус 20 °С с соблюдением требований «холодовой цепи» в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Допускается транспортирование набора реагентов при температуре до плюс 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

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

8.3 Срок годности набора

Набор реагентов должен применяться согласно утвержденной инструкции по применению. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем.

Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

8.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 (либо специально предназначенное вспомогательное помещение) (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации, согласно требованиям, СанПиН 2.1.3684-21.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, а также являющиеся подделками или незаконными копиями изделий, зарегистрированных в Российской Федерации, а также изделия, обнаруженные и конфискованные таможенными органами Российской Федерации при их ввозе на территорию Российской Федерации, утилизируют

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО (СанПиН 2.1.3684-21).

Компоненты набора «Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-Р НТМБ-Дифф» и «Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы ДНК МБТК и НТМБ в стрипованных микропробирках, ПКО-МБТК-НТМБ», содержащие азид натрия, утилизируются путем смыва их в водопроводно-канализационную систему с предварительным разведением водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный и бытовой мусор.

8.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» направлять на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол»: г. Москва, 125499, Кронштадтский бульвар, д. 39, к. 1, тел. +7(495)984-69-93, факс. +7(499)977-74-55, Email: syntol@syntol.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Только для *in vitro* диагностики
	Температурный диапазон
	Годен до
	Код партии (серия)
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Количество тестов (определений)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 47 листов

Генеральный директор
ООО «НПФ Синтол»

А.В.Кузубов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Москва, 125499, Кронштадтский бульвар, д.39, к.1
Тел: (499)977-74-55 e-mail: syntol@syntol.ru

ООО «НПФ Синтол»
ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

«Амплитуб-НТМБ - дифференциация»

Набор реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) и нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), а также дифференциальной диагностики видов НТМБ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) «Амплитуб-НТМБ-дифференциация»

LOT **XXXXXX**	Наборов в серии **XX**	Дата изготовления **XX.XXXX**

1.Состав, внешний вид

Наименование компонента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе
Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, **РС-Р НТМБ-Дифф**	Лиофильный концентрат от светло-розового до светло-сиреневого цвета, 0,005 мл	соответствует	60 стрипов по 4 микропробирки
Реакционная смесь, содержащая положительные контрольные образцы ДНК МБТК и ДНК НТМБ, в стрипованных микропробирках, **ПКО-МБТК-НТМБ**	Лиофильный концентрат от светло-розового до светло-сиреневого цвета, 0,005 мл	соответствует	12 стрипов по 4 микропробирки
Деионизированная вода, **ddH_2O**	Прозрачная бесцветная жидкость, 1,7 мл	соответствует	2
Инструкция по применению		наличие	1
Паспорт качества		наличие	1

2.Технические характеристики

Наименование показателя	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Положительный результат ПЦР-РВ	Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 35,0 в пробирках с ПКО-МБТК-НТМБ по каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.	соответствует
Отрицательный результат ПЦР-РВ	Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 35 в пробирках ОКО с РС-Р НТМБ-Дифф по каналу Cy5.5. Отсутствует рост сигнала в 1-ой пробирке контрольного стрипа ОКО с РС-Р НТМБ-Дифф по каналам FAM и HEX. Отсутствует рост сигнала или зарегистрирован рост сигнала с Ct более 37 в 1-ой пробирке контрольного стрипа ОКО с РС-Р НТМБ-Дифф по каналу ROX. Отсутствует рост сигнала во 2÷4-ой пробирках контрольного стрипа ОКО с РС-Р НТМБ-Дифф по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5.	соответствует
Аналитическая чувствительность	Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 37,0 во всех пробирках стрипа с РС-Р НТМБ-Дифф для СКО-МБТК-НТМБ по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5.	соответствует

Заключение ОБТК: «Набор реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) и нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), а также дифференциальной диагностики видов НТМБ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» серии LOT **XXXXXX** по своим показателям соответствует требованиям ТУ 21.20.23-005-97313483-2022.

Годен до: XX.XXXX

Условия транспортирования: крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от минус 16 до минус 20 °С с соблюдением требований «холодовой цепи» в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой.

Допускается транспортирование набора реагентов при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Условия хранения: хранить при температуре от минус 16 до минус 20 °С в условиях естественной влажности и защиты от света (морозильная камера). Суммарный срок хранения при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не должен превышать 5 суток в течение срока годности набора реагентов.

Начальник отдела ОБТК

«XX» XXXX г

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU