

«УТВЕРЖДАЮ»

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



Г.А. Шипулин

«*me*»

2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления мутаций, связанных
с лекарственной устойчивостью микобактерий
туберкулёзного комплекса к рифампицину и изониазиду,
методом полимеразной цепной реакции
«АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo»



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАИМЕНОВАНИЕ.....	4
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	5
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	5
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ	5
ПРИНЦИП МЕТОДА	6
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА	8
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	13
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	15
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	17
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	20
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	20
А. Подготовка проб для амплификации.....	20
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	23
В. Анализ и интерпретация результатов	24
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	31
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	32
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 – Интерпретация результатов для исследуемых образцов в некоторых наиболее распространенных частных случаях	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхоальвеолярный лаваж
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент – количество ДНК-мишени, соответствующее одному геному микобактерии туберкулёзного комплекса
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
L+ МБТ-wt	- положительный контроль ПЦР, включающий фрагменты ДНК МБТ, которые не содержат мутаций, связанных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду (дикого типа)
L+ МБТ-mut	- положительный контроль ПЦР, включающий фрагменты ДНК МБТ, которые содержат несколько мутаций, связанных с устойчивостью как к рифампицину, так и к изониазиду
К-	- отрицательный контроль ПЦР
МБТ	- микобактерии туберкулёзного комплекса, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
МУ	- методические указания
ПО	- программное обеспечение
ПО «FRT Manager»	- программное обеспечение для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870)
ПТП	- противотуберкулёзный препарат
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
РФ	- Российская Федерация
СанПиН	- санитарно-эпидемиологические правила и нормы
СОП № 1 ПКО ДНК МБТ-wt	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ дикого типа (без мутаций в анализируемых генах)
СОП № 2 ПКО ДНК МБТ mut RH	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутацией S531L в гене <i>groB</i> , связанной с устойчивостью МБТ к рифампицину, и с мутацией S315T1 в гене <i>katG</i> , связанной с устойчивостью МБТ к изониазиду
СОП № 3 ПКО ДНК МБТ H37Ra-wt	- стандартный образец предприятия, содержащий ДНК штамма <i>M. tuberculosis</i> H37Ra (без мутаций в анализируемых генах)
СОП № 4 ПКО ДНК МБТ mut R	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутацией H526Y в гене <i>groB</i> , связанной с устойчивостью МБТ к рифампицину
СОП № 5 ПКО ДНК МБТ mut H	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутацией S315T1 в гене <i>katG</i>
ТБ	- туберкулёз
УДГ, UDG	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

RRDR (область гена <i>groV</i>)	- Rifampicin Resistance Determining Region – область, определяющая устойчивость к рифампицину, – участок гена <i>groV</i> длиной 81 п.о., включающий кодоны 507-533 в общепринятой нумерации по <i>E. coli</i> , или кодоны 426-452 в нумерации по <i>M. tuberculosis</i> , мутации в которых связаны с устойчивостью МБТ к рифампицину
----------------------------------	---

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёзного комплекса к рифампицину и изониазиду, методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo» (далее – набор реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo», набор реагентов).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления в качественном формате мутаций в ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (включает *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*), связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину (в области RRDR и кодоне 572 гена *groV*) и изониазиду (в кодоне 315 гена *katG* и участке промоторной области гена *inhA*), в пробах ДНК, полученных в результате экстракции из образцов биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), биоптата (операционного материала), мочи) и культур микобактерий туберкулёза, методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Функциональное назначение – лабораторная диагностика туберкулёза (ТБ) с лекарственной устойчивостью возбудителя (*Mycobacterium tuberculosis complex*) к рифампицину и/или изониазиду, в том числе ТБ с множественной лекарственной устойчивостью, а именно выявление генетических маркёров резистентности *M. tuberculosis complex* к рифампицину и изониазиду с помощью молекулярно-генетического метода исследования.

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

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется при обследовании больных туберкулёзом с целью правильного и своевременного назначения соответствующей схемы химиотерапии ТБ.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные в результате экстракции из исследуемых образцов биологического материала с помощью зарегистрированного на территории РФ набора реагентов для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК *M. tuberculosis* complex, например, набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838), и содержащие ДНК МБТ в концентрации не менее 5×10^2 геномных эквивалентов в 1 мл (ГЭ/мл), а также пробы ДНК, полученные экстракцией из культур микобактерий туберкулёза.

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

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

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

Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на одновременной амплификации участков ДНК МБТ, включающих области расположения анализируемых мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, и ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО)¹ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать прохождение реакции амплификации.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации за счет измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для выявления мутаций используются олигонуклеотидные зонды, комплементарные ДНК МБТ дикого типа (кроме зонда, выявляющего мутацию S531L в гене *groB*). Такой подход позволяет выявлять максимальный спектр целевых мутаций, в первую очередь в области RRDR гена *groB*. При использовании указанного подхода отсутствие нарастания флуоресценции (отсутствие порогового цикла (*Ct*)) означает наличие мутации на участке гибридизации зонда, комплементарного ДНК МБТ дикого типа. Используемые олигонуклеотидные зонды охватывают всю область RRDR гена *groB*, область кодона 572 гена *groB*, область кодона 315 гена *katG* и участок промоторной области гена *inhA* (включающий позиции -8 и -15). Дополнительно используется один олигонуклеотидный зонд, ком-

¹ ВКО добавляется в анализируемый образец на этапе экстракции из него нуклеиновых кислот или на этапе подготовки к амплификации с детекцией в режиме «реального времени» (см. раздел «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала»)

плементарный участку гена *groB*, содержащему доминирующую по распространенности мутацию S531L (этот дополнительный зонд входит в состав Смеси-FL МБТ-Р № 1-Lyo, его сигнал регистрируется по каналу для флуорофора ROX).

Выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину (в гене *groB*) и изониазиду (в гене *katG*, промоторной области гена *inhA*), для одного образца проводится в трех пробирках. В двух пробирках выявляются мутации в области RRDR гена *groB*, в третьей пробирке – мутации в кодоне 315 гена *katG*, участке промоторной области гена *inhA*, кодоне 572 гена *groB* и осуществляется детекция ВКО. Результаты амплификации анализируемых фрагментов генов, а также ДНК ВКО для каждой реакционной смеси регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5
Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)			
№ 1-Lyo	область кодона 531 гена <i>groB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 516 гена <i>groB</i> (область RRDR) (без мутаций)	мутация S531L в гене <i>groB</i> (область RRDR)	область кодона 526 гена <i>groB</i> (область RRDR) (без мутаций)
№ 2-Lyo	область кодона 511 гена <i>groB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 513 гена <i>groB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 522 гена <i>groB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 533 гена <i>groB</i> (область RRDR) (без мутаций)
№ 3-Lyo	область кодона 315 гена <i>katG</i> (без мутаций)	область кодона 572 гена <i>groB</i> (область вне RRDR) (без мутаций)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последовательность)	участок промоторной области гена <i>inhA</i> (без мутаций)

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения термолабильного фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ, UDG) и дезоксиуридин-

трифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащих дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

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

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входит «ПЦР-комплект» вариант FRT-64 L, который содержит три разные реакционные смеси в лиофилизированном виде в стрипах по 8 пробирок, различающиеся между собой маркировкой пробирок. Каждый стрип содержит реакционную смесь одного вида: Смесь-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-Р № 2-Lyo, Смесь-FL МБТ-Р № 3-Lyo. Таким образом, для анализа одного образца требуется по одной пробирке из трех разных стрипов.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-64 L предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием приборов только планшетного типа и позволяет определять ДНК в качественном формате.

Набор реагентов рассчитан на проведение 192 реакций амплификации (всего 64 теста), включая контроли.

КОМПЛЕКТНОСТЬ

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-64 L – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *M. tuberculosis complex*

(фрагментов генов *rpoB*, *katG*, промоторной области гена *inhA*) и выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* complex к рифампицину и изониазиду, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь-FL МБТ-Р № 1-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	–	2 стрипа по 8 пробирок x 4
Смесь-FL МБТ-Р № 2-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	–	2 стрипа по 8 пробирок x 4
Смесь-FL МБТ-Р № 3-Lyo	Гранула белого цвета шарообразной формы	–	2 стрипа по 8 пробирок x 4
L+ МБТ-wt	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
L+ МБТ-mut	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Набор реагентов рассчитан на проведение 192 реакций амплификации (всего 64 теста), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 — Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo»

Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи), культуры МБТ	5×10^2

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании стандартного образца предприятия (СОП) № 3 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК штамма *M. tuberculosis* H37Ra дикого типа (без мутаций)» (СОП № 3 ПКО ДНК МБТ H37Ra-wt) в концентрации 1×10^7 ГЭ/мл, а также СОП № 2 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями S531L в области RRDR гена *groB* и S315T1 в гене *katG*» (СОП № 2 ПКО ДНК МБТ mut RH), СОП № 4 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутацией H526Y в области RRDR гена *groB*» (СОП № 4 ПКО ДНК МБТ mut R), СОП № 5 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутацией S315T1 в гене *katG*» (СОП № 5 ПКО ДНК МБТ mut H) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл каждого СОП, и препарата ДНК *Mycobacterium bovis* Vallee № 700203 (без мутаций в анализируемых генах) в концентрации 1×10^7 ГЭ/мл. Набор реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo» не выявляет мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, при тестировании СОП № 3 ПКО ДНК МБТ H37Ra-wt и препарата ДНК *Mycobacterium bovis* Vallee № 700203, не содержащих мутации ни в одном из анализируемых генов, и специфично выявляет мутации в ДНК МБТ, связанные с лекарственной устойчивостью МБТ к рифампицину при тестировании СОП № 2 ПКО ДНК МБТ mut RH и СОП № 4 ПКО ДНК МБТ mut R, к изониазиду – при тестировании СОП № 2 ПКО ДНК МБТ mut RH и СОП № 5 ПКО ДНК МБТ mut H.

Отсутствие неспецифических положительных результатов подтверждено при использовании препаратов ДНК штаммов следующих микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: нетуберкулёзных микобактерий – *Mycobacterium avium* № 700758, *Mycobacterium kansasii* № 700700, *Mycobacterium fortuitum* № 700711 (из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); гетерологичных микроорганизмов – *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33862, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 700324, *Haemophilus influenza* ATCC® 33930,

Corynebacterium jeikeium ATCC® 43734 (из коллекции American Type Culture Collection® (ATCC®), США), а также препарата геномной ДНК человека № D7011 («Sigma-Aldrich», США). Неспецифических положительных результатов выявлено не было – во всех случаях получен результат «Недостаточно ДНК МБТ для анализа».

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Интерферирующие вещества могут как находиться в образце биологического материала или культуры МБТ, так и попасть в него на этапе пробоподготовки. Применение набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo» подразумевает использование не нативных образцов биологического материала или культур МБТ, а уже выделенной из них тотальной ДНК, которая содержит ДНК МБТ в определенной концентрации, т.е. набор реагентов не подвержен влиянию способа пробоподготовки биологического материала или культуры МБТ.

Для пробоподготовки образцов перед тестированием с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo» рекомендуются к применению только зарегистрированные в РФ наборы реагентов для диагностики туберкулёза молекулярно-генетическими методами.

Для контроля эффективности реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрена одновременная амплификация ДНК МБТ и внутреннего контрольного образца (ВКО). ВКО добавляется в каждую пробу ДНК, выделенную из биологического материала или культуры микобактерий туберкулёза, на этапе экстракции нуклеиновых кислот при использовании набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838) или на этапе подготовки к амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при использовании аналогичного набора реагента другого производителя. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит об эффективности ПЦР.

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

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования была определена в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные модельные образцы представляли собой разведение стандартного образца предприятия СОП № 2 ПКО ДНК МБТ mut RH в концентрации 5×10^2 ГЭ/мл, в качестве отрицательных модельных образцов было использовано разведение СОП № 1 ПКО ДНК МБТ-wt в концентрации 5×10^2 ГЭ/мл. Для положительных образцов получен соответствующий результат «Обнаружена мутация, связанная с устойчивостью МБТ к рифампицину; обнаружена мутация, связанная с устойчивостью МБТ к изониазиду». Для отрицательных образцов получен соответствующий результат «Не обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к рифампицину; не обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к изониазиду».

Результаты исследования для набора реагентов представлены в табл. 3.

Таблица 3 — Воспроизводимость исследования для набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo»

Тип образцов	Внутри постановки (повторяемость)		Между сериями		Между лабораториями (воспроизводимость)		Итого	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
СОП № 2 ПКО ДНК МБТ mut RH (5×10^2 ГЭ/мл) – положительные образцы	6	100	12	100	12	100	18	100
СОП № 1 ПКО ДНК МБТ-wt (5×10^2 ГЭ/мл) – отрицательные образцы	6	100	12	100	12	100	18	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические чувствительность и специфичность набора реагентов с доверительной вероятностью 95 % были определены на основании результатов клинических испытаний с использованием проб ДНК из образцов биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), биоптата (операционного материала), мочи), содержащих ДНК МБТ, и культуры микобактерий туберкулёза испытуемым набором реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Луо», а также методом сравнения². Дискордантных результатов не выявлено.

Результаты клинических испытаний набора реагентов представлены в табл. 4, диагностические показатели набора – в табл. 5.

Таблица 4 — Результаты оценки диагностических показателей набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Луо» относительно набора сравнения

Вид исследуемого материала (общее количество образцов)	ПТП	Результаты применения набора реагентов	Результаты применения референтного метода	
			Обнаружены мутации (положительные)	Не обнаружены мутации (отрицательные)
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи) (N=251)	Рифампицин	Обнаружены мутации (положительные)	121	0
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	130
	Изониазид	Обнаружены мутации (положительные)	119	0
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	132

² При исследовании проб ДНК из мокроты, БАЛ, биоптата и культуры микобактерий туберкулёза изделием сравнения являлся набор реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России; РУ № РЗН 2022/16720), при анализе проб ДНК из мочи – набор реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия; РУ № ФСР 2010/07636).

Вид исследуемого материала (общее количество образцов)	ПТП	Результаты применения набора реагентов	Результаты применения референтного метода	
			Обнаружены мутации (положительные)	Не обнаружены мутации (отрицательные)
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулёза (N=101)	Рифампицин	Обнаружены мутации (положительные)	51	0
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	50
	Изониазид	Обнаружены мутации (положительные)	50	0
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	51

Таблица 5 — Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo»

Вид исследуемого материала (общее количество образцов)	Выявление мутаций, связанных с устойчивостью	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 %)
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи) (N=251)	к рифампицину	97,00-100 %	97,20-100 %
	к изониазиду	96,95-100 %	97,24-100 %
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулёза (N=101)	к рифампицину	93,02-100 %	92,89-100 %
	к изониазиду	92,89-100 %	93,02-100 %

³ Диагностическая чувствительность относительно использованного набора сравнения.

⁴ Диагностическая специфичность относительно использованного набора сравнения.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Соблюдать температуру в помещении лаборатории от плюс 20 до плюс 28 °С и относительную влажность воздуха от 15 до 75 %.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтрами. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

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

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

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

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории

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

в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

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

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

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

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

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл

- или 0,6 мл (например, «Ахуген», США) для подготовки проб ДНК к амплификации.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 и до 100 или до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 3. Штативы для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
 6. Автоматические дозаторы переменного объема до 10 и до 100 или до 200 мкл (например, Biohit, Финляндия).
 7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd. («Лайф Текнолоджис Холдингс Птс. Лтд»), Сингапур)).
 8. Программное обеспечение для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870).
 9. Набор реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Ампли-Тест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838) (для экстракции ДНК и отбора проб с концентрацией ДНК МБТ не менее 5×10^2 ГЭ/мл).
 10. Холодильник от плюс 2 до плюс 8 °С.
 11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 12. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-I Lyo» являются пробы ДНК, полученные в результате экстракции из образцов биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, биоптата (операционного материала), мочи) и содержащие ДНК МБТ в концентрации не менее 5×10^2 ГЭ/мл, а также пробы ДНК, полученные экстракцией из культур микобактерий туберкулёза.

Нативные образцы биологического материала человека (до выделения из них ДНК) собирают в стерильные одноразовые градуированные плотно закрывающиеся емкости из полипропилена объемом 20-100 мл с широким горлом. После этого образцы подвергают предварительной обработке с помощью NALC-NaOH с целью их деконтаминации и гомогенизации в соответствии с Приказом Минздрава России от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации (с изменениями на 5 июня 2017 года)» с получением осадков («единых проб»), которые пригодны для исследований как микробиологическими, так и молекулярно-генетическими методами.

Образцы культур микобактерий туберкулёза не подвергают предварительной обработке с помощью NALC-NaOH.

Последующую экстракцию нуклеиновых кислот из предварительно обработанных исследуемых образцов, обнаружение в них ДНК МБТ и ее количественную оценку выполняют с использованием соответствующего набора реагентов для диагностики туберкулёза молекулярно-генетическими методами, зарегистрированного на территории РФ, например, набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838), в соответствии с инструкцией по его применению.

Пробы ДНК получают и хранят в виде растворов в закрывающихся или плотно закрывающихся полипропиленовых

пробирках объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

Допускается хранение проб ДНК МБТ до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – 1 неделя;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается транспортирование проб ДНК МБТ при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 1 суток в термоконтейнерах, содержащих холодоэлементы.

ВНИМАНИЕ! Объем пробы ДНК МБТ (после экстракции), предназначенной для исследования, должен быть не менее 80 мкл.

ВНИМАНИЕ! Пробы ДНК, полученные экстракцией из образцов культур микобактерий туберкулёза, которые были выращены на плотных питательных средах, и содержащие ДНК МБТ в концентрации выше 1×10^9 ГЭ/мл, перед проведением амплификации рекомендуется разводить до 1×10^7 ГЭ/мл или ниже во избежание ингибирования ПЦР.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество цефленовых пакетов с тремя различными готовыми лиофилизированными реакционными смесями: Смесью-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесью-FL

МБТ-Р № 2-Lyo, Смесь-FL МБТ-Р № 3-Lyo, для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 5). Каждый цефленовый пакет содержит по два стрипа с одноименной смесью. Для анализа одного образца требуется по одной пробирке из трех стрипов с разными смесями.

2. Вскрыть цефленовые пакеты, извлечь стрипы с различными лиофилизированными реакционными смесями и расставить в штативе по порядку: сначала смесь № 1, затем № 2 и потом № 3.

ВНИМАНИЕ! Цефленовые пакеты, содержащие Смесь-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-Р № 2-Lyo и Смесь-FL МБТ-Р № 3-Lyo, необходимо вскрывать непосредственно перед использованием указанных реагентов. Не хранить лиофилизированные смеси после вскрытия цефленовых пакетов!

3. В анализируемую пробу ДНК МБТ внести реагент **ВКО-М** на этапе подготовки к амплификации, если он не был добавлен в анализируемый образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот: однократно внести в каждую пробу ДНК объемом 80 мкл по 4 мкл **ВКО-М** (можно изменять объем пробы, но **ВКО-М** необходимо добавлять пропорционально объему пробы 1:20), перемешать и осадить капли на вортексе (при получении пробы экстракцией методом сорбции на силикагеле повторить центрифугирование для осаждения частиц сорбента). При повторном проведении амплификации для тех же проб **ВКО-М** в них не вносится.

ВНИМАНИЕ! При использовании для отбора проб ДНК МБТ набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838) **ВКО-М** в анализируемую пробу ДНК МБТ не вносить на этапе подготовки к амплификации, так как он был добавлен на этапе экстракции нуклеиновых кислот.

ВНИМАНИЕ! При использовании для отбора проб ДНК МБТ формы 1 набора реагентов «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП»

ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838) перед анализом с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» рекомендуется разбавить анализируемую пробу ДНК МБТ РНК-буфером (входящим в состав набора «АмплиТест® МБТ») в 2 раза во избежание быстрого расходования анализируемой пробы и ее нехватки на все последующие тесты.

4. В три пробирки с различными реакционными смесями внести по **23 мкл** каждой пробы ДНК (в одном повторе), полученной в результате экстракции из исследуемых образцов, и подготовленной к амплификации согласно пункту 3.

ВНИМАНИЕ! Объем экстрагированной пробы ДНК МБТ, предназначенной для исследования, должен быть не менее **80 мкл**.

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

5. Поставить контрольные реакции (по одному повтору каждой):
 - а) **положительный контроль ПЦР (L+ wt)** – в три пробирки с различными реакционными смесями внести по **23 мкл L+ МБТ-wt**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (L+ mut)** – в три пробирки с различными реакционными смесями внести по **23 мкл L+ МБТ-mut**;
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – в три пробирки с различными реакционными смесями внести по **23 мкл K–**;

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

ВНИМАНИЕ! В случае тестирования небольшого количества образцов рекомендуется НЕ вносить образцы в крайние ячейки планшета (по горизонтали A/H1-12, по вертикали B/C/D/E/F/G1 и B/C/D/E/F/G12). При тестировании максималь-

ного количества образцов (при полной загрузке прибора) в указанные крайние ячейки рекомендуется вносить **L+ МБТ-mut**, **K-** и пробы в концентрации ДНК МБТ не менее 1×10^4 ГЭ/мл.

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

1. При использовании программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (далее – ПО «FRT Manager») (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870) постановка ПЦР-РВ осуществляется согласно руководству пользователя указанного ПО.

В случае запуска постановки с помощью ПО амплификатора необходимо запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 6).

Таблица 6 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для всех рекомендованных приборов планшетного⁶ типа

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

2. Установить стрипованные пробирки в ячейки реакционного модуля прибора строго в определенном порядке для каждого образца (включая контроли): сначала должна идти пробирка с реакционной смесью **№ 1**, далее – со смесью **№ 2**, за-

⁶ CFX96 (Bio-Rad), ДТнпрайм (ДНК-Технология), QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.).

тем – со смесью № 3. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки прибора (тестирования небольшого количества образцов) рекомендуется НЕ располагать образцы в крайних ячейках реакционного модуля амплификатора. В этом случае рекомендуется дополнительно установить пустые стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала с помощью ПО «FRT Manager» или ПО амплификатора.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

При использовании для запуска постановки ПО «FRT Manager» анализ полученных данных и интерпретация результатов проводятся автоматически. В случае использования запуска посредством ПО амплификатора анализ и интерпретацию результатов осуществляют вручную. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем различным каналам флуоресцентной детекции и реакционным смесям в соответствии с табл. 1 настоящей инструкции. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (указана во вкладыше к набору), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

Сначала анализируют результаты, полученные для контрольных образцов. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 7 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 7 — Контроль достоверности этапов экстракции ДНК и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
			FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5
№ 1-Lyo	К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
№ 2-Lyo			отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
№ 3-Lyo			отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
№ 1-Lyo	L+ wt	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
№ 2-Lyo			<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
№ 3-Lyo			<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
№ 1-Lyo	L+ mut	ПЦР	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше гра- ничного	отсутствует
№ 2-Lyo			<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	не учитыва- ется
№ 3-Lyo			отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует

Затем анализируют результаты, полученные для исследуемых образцов, по схеме, описанной ниже.

Принципы интерпретации результатов следующие:

1. Результат выявления мутаций, связанных с устойчивостью к **рифампицину** (ограничения см. в пункте 3):
 - 1.1. **Не обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к рифампицину**, если для данной пробы соблюдаются все три перечисленные ниже условия:
 - определены значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM, JOE (HEX, VIC), Cy5, и отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 1-Lyo**,
 - определены значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM, JOE (HEX, VIC), ROX и Cy5 в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 2-Lyo**,

- определено значение *Ct* по каналу для флуорофора JOE (HEX, VIC) в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Лyo. При этом значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Лyo (детекция ВКО) не учитывается, т.к. в этом случае область RRDR гена *groB* без мутаций является эндогенным внутренним контролем.

1.2. Обнаружена мутация, связанная с устойчивостью МБТ к рифампицину, если для данной пробы соблюдается хотя бы одно из перечисленных ниже условий:

- отсутствует значение *Ct* по одному или нескольким каналам для флуорофоров FAM, JOE (HEX, VIC), Cy5 и/или определено значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 1-Лyo,
- отсутствует значение *Ct* по одному или нескольким каналам для флуорофоров FAM, JOE (HEX, VIC), ROX, Cy5 в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 2-Лyo,
- отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора JOE (HEX, VIC) в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Лyo.

ВНИМАНИЕ! Если для данной пробы отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 1-Лyo, то допустимо отсутствие *Ct* еще не более чем по четырем каналам (из перечисленных выше) суммарно для всех трех Смесей-FL (ограничения см. в пункте 3), при этом имеющиеся значения *Ct* могут превышать граничные значения не более чем по трем каналам, а значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Лyo (детекция ВКО) должно быть меньше или равно граничному.

ВНИМАНИЕ! Если для данной пробы определено значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 1-Лyo, то допустимо отсутствие *Ct* более чем по четырем каналам суммарно для всех трех Смесей-FL (но не в одной Смеси-FL), при этом имеющиеся значения *Ct* могут превышать граничные значения по всем каналам, и значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Лyo (детекция ВКО) не учитывается. В данном случае результатом будет «Обнаружена мутация S531L в гене *groB*, связанная с устойчивостью МБТ к рифампицину».

2. Результат выявления мутаций, связанных с устойчивостью к изониазиду (ограничения см. в пункте 3):
- 2.1. Не обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к изониазиду, если для данной пробы определены значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и Cy5 в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo.
- 2.2. Обнаружена мутация, связанная с устойчивостью МБТ к изониазиду, если для данной пробы отсутствует значение Ct по каналу для флуорофора FAM, и определены значения Ct меньше или равные граничным для флуорофоров ROX (детекция ВКО) и Cy5 в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo, или
- Обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к изониазиду, если для данной пробы отсутствуют значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и Cy5, и определено значение Ct меньше или равное граничному по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo (детекция ВКО).
- 2.3. Обнаружена мутация, связанная с устойчивостью низкого уровня МБТ к изониазиду, если для данной пробы отсутствует значение Ct по каналу для флуорофора Cy5, и определены значения Ct меньше или равные граничным для флуорофоров ROX (детекция ВКО) и FAM в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo.
3. Ограничения. Перечисленные выше результаты выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, учитываются в случае, если полученные для пробы данные не соответствуют описанным далее вариантам: «Недостаточно ДНК МБТ для анализа», «Результат невалидный» или «Ошибка».
- 3.1. Недостаточно ДНК МБТ для анализа, если наблюдается один из следующих вариантов:
- отсутствуют значения Ct одновременно по пяти или более каналам для флуорофоров из перечисленных далее: FAM, JOE (HEX, VIC) и Cy5 в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 1-Lyo; FAM, JOE (HEX, VIC), ROX и Cy5 в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 2-Lyo и JOE (HEX, VIC) в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo, – и определено значение Ct

меньше или равное граничному в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 3-Луо** по каналу для флуорофора ROX (детекция ВКО);

- отсутствуют значения C_t по одному или нескольким каналам, и значения C_t превышают граничные по четырем каналам для флуорофоров из перечисленных далее: FAM, JOE (HEX, VIC) и Cy5 в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 1-Луо**; FAM, JOE (HEX, VIC), ROX и Cy5 в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 2-Луо** и JOE (HEX, VIC) в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 3-Луо**, – и определено значение C_t меньше или равное граничному в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 3-Луо** по каналу для флуорофора ROX (детекция ВКО);
- отсутствуют значения C_t одновременно по всем четырем каналам в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 1-Луо** и/или со **Смесью-FL МБТ-Р № 2-Луо**, а присутствующие значения C_t по всем каналам в остальных пробирках превышают граничные, кроме значения C_t в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 3-Луо** по каналу для флуорофора ROX (детекция ВКО), которое определено меньше или равное граничному.

Если получен результат «Недостаточно ДНК МБТ для анализа», то исследуемая проба ДНК не может быть проанализирована с помощью данного набора реагентов, поскольку содержание ДНК МБТ в ней ниже аналитической чувствительности набора реагентов или ДНК МБТ отсутствует.

3.2. Результат невалидный, если для данной пробы наблюдается один из следующих вариантов:

- значение C_t отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора ROX в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 3-Луо** (детекция ВКО), и отсутствуют значения C_t одновременно по пяти или более каналам из перечисленных далее: FAM, JOE (HEX, VIC) и Cy5 в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 1-Луо**; FAM, JOE (HEX, VIC), ROX и Cy5 в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 2-Луо** и JOE (HEX, VIC) в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 3-Луо**.
- значение C_t отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора ROX в пробирке со **Смесью-FL МБТ-Р № 3-Луо** (детекция ВКО), и отсутствуют значения C_t по од-

ному или нескольким другим каналам, и значения C_t превышают граничные по четырем каналам из перечисленных далее: FAM, JOE (HEX, VIC) и Cy5 в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 1-Lyo; FAM, JOE (HEX, VIC), ROX и Cy5 в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 2-Lyo и JOE (HEX, VIC) в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo.

Если получен «Результат невалидный», то необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

3.3. Ошибка, если для исследуемого образца отсутствуют значения порогового цикла (C_t) одновременно по всем четырем каналам в одной или нескольких пробирках со Смесьями-FL, при этом выполняется одно из следующих условий:

- присутствующие значения C_t (все или некоторые) не превышают граничных значений;
- значение C_t отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора ROX в пробирке со Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo (детекция ВКО).

Если получен результат «Ошибка», то необходимо провести повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Примеры результатов частных случаев выявления мутаций приведены в Приложении 1.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (L+ wt) значение порогового цикла (C_t) отсутствует или превышает граничное значение по каналам, где оно должно быть определено меньше граничного согласно таблице 7. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов.
2. Для положительного контроля ПЦР (L+ mut) значение порогового цикла (C_t) отсутствует или превышает граничное значение по каналам, где оно должно быть определено меньше граничного согласно таблице 7 или определено значение порогового цикла (C_t) по каналам, где оно

должно отсутствовать согласно таблице 7. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) определено значение порогового цикла (C_t) по одному или нескольким каналам. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести ПЦР-исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Хранение.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-64 L хранить в холодильной камере при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

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

Не хранить лиофилизированные Смесь-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-Р № 2-Lyo и Смесь-FL МБТ-Р № 3-Lyo после вскрытия цефленовых пакетов!

Смесь-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-Р № 2-Lyo и Смесь-FL МБТ-Р № 3-Lyo беречь от воздействия солнечного света.

Не использовать лиофилизированные Смесь-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-Р № 2-Lyo и Смесь-FL МБТ-Р № 3-Lyo из поврежденных цефленовых пакетов!

Реагенты L+ МБТ-wt, L+ МБТ-mut, ВКО-М, К- после вскрытия допускается хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С до истечения срока годности набора реагентов.

Холодильная камера должна обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

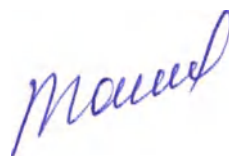
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1, e-mail: promlab@cspfmmba.ru.

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

Руководитель
производственной лаборатории



Ж.Е.Тарасова

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно
для проведения <n>-тестов



Медицинское
изделие для
диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции
по применению или к
инструкции по
применению в электронном
виде



Температурный диа-
пазон



Не допускать воздействия
солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Не допускать
воздействия влаги



Не использовать при по-
вреждении упаковки и об-
ратиться к инструкции по
применению

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 – Интерпретация результатов для исследуемых образцов в некоторых наиболее распространенных частных случаях

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Не обнаружены
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	+	+	не учитывается	+		
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Обнаружена (мутация в кодоне 315 гена <i>katG</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	–	+	+	+		
			≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Обнаружены (мутации в кодоне 315 гена <i>katG</i> и промоторе гена <i>inhA</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	–	+	+	–		
			≤ граничного			
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Обнаружена мутация, связан- ная с устойчиво- стью низкого уровня (в промо- торе гена <i>inhA</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	+	+	+	–		
	≤ граничного	+	≤ граничного			
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	Не обнаружены
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	+	+	не учитывается	+		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	Обнаружена (мутация в кодоне 315 гена <i>katG</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	–	+	+	+		
			≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена	Обнаружены

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается	мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	(мутации в кодоне 315 гена <i>katG</i> и промо- торе гена <i>inhA</i>)
№ 3-Lyo	–	+	+	–		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	Обнаружена мутация, связан- ная с устойчиво- стью низкого уровня (в промо- торе гена <i>inhA</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	+	+	+	–	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i> (в смеси с ДНК без мутаций в кодоне 531 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 1-Lyo	+	+	+	+		
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	+	+	не учитывается	+	Обнаружена (мутация в области кодона 531 гена <i>rpoB</i> , но HE S531L)	Обнаружена (мутация в кодоне 315 гена <i>katG</i>)*
№ 1-Lyo	–	+	–	+		
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 516 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 1-Lyo	+	–	–	+		
№ 2-Lyo	+	не учитывается	+	+		
№ 3-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена	Не обнаружены*
№ 1-Lyo	+	+	–	–		

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 2-Lyo	+	+	+	+	(мутация в области кодона 526 гена <i>rpoB</i>)	
№ 3-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 511 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	–	+	+	+		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 513 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	не учитывается	+	+	+		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 522 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	+	+	+	+		
№ 1-Lyo	не учитывается	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 533 гена <i>rpoB</i>)	Обнаружена (мутация в кодоне 315 гена <i>katG</i>)*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	+	+	+	+		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена	Обнаружена (мутация)

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 2-Lyo	+	+	+	+	(мутация в области кодона 572 гена <i>rpoB</i>)	в кодоне 315 гена <i>katG</i>)*
№ 3-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружены (2 мутации в гене <i>rpoB</i> : S531L и в об- ласти кодона 572)	Обнаружена (мутация в кодоне 315 гена <i>katG</i>)*
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	–	+	–	–	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	–	–	+	–		
№ 3-Lyo	не учитывается	+	≤ граничного	не учитывается		
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	≤ граничного	> граничного	+	> граничного		
№ 3-Lyo	> граничного	> граничного	≤ граничного	–		
№ 1-Lyo	не учитывается	+	+	не учитывается	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного	не учитывается		
№ 3-Lyo	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного	не учитывается		
№ 1-Lyo	–	+	–	–	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	–	+	+	–		
№ 3-Lyo	не учитывается	> граничного	> граничного	не учитывается		
№ 1-Lyo	–	+	–	–	Невалидный	
№ 2-Lyo	–	–	+	–		
№ 3-Lyo	+	+	–/+	+		

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 – Интерпретация результатов для исследуемых образцов в некоторых наиболее распространенных частных случаях

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Не обнаружены
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	+	+	не учитывается	+		
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Обнаружена (мутация в гене <i>katG</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	–	+	+	+		
			≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Обнаружены (мутации в гене <i>katG</i> и промоторе гена <i>inhA</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	–	+	+	–		
			≤ граничного			
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Не обнаружены	Обнаружена мутация, связан- ная с устойчиво- стью низкого уровня (в промо- торе гена <i>inhA</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	+		
№ 3-Lyo	+	+	+	–		
	+	+	+	–		
	≤ граничного	+	≤ граничного			
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	Не обнаружены
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	+	+	не учитывается	+		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	Обнаружена (мутация в гене <i>katG</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	–	+	+	+		
			≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена	Обнаружены

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается	мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	(мутации в гене <i>katG</i> и промоторе гена <i>inhA</i>)
№ 3-Lyo	–	+	≤ граничного	–		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i>	Обнаружена мутация, связан- ная с устойчи- востью низкого уровня (в промо- торе гена <i>inhA</i>)
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	≤ граничного	+	≤ граничного	–		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена мутация S531L в гене <i>rpoB</i> (в смеси с ДНК без мутаций в кодоне 531 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	+	+	не учитывается	+		
№ 1-Lyo	–	≤ граничного	–	≤ граничного	Обнаружена (мутация в области кодона 531 гена <i>rpoB</i> , но НЕ S531L)	Обнаружена (мутация в гене <i>katG</i>)*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	не учитывается		
№ 3-Lyo	–	≤ граничного	не учитывается	≤ граничного		
№ 1-Lyo	≤ граничного	–	–	≤ граничного	Обнаружена (мутация в области кодона 516 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	≤ граничного	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного		
№ 3-Lyo	+	≤ граничного	≤ граничного	+		
№ 1-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	–	Обнаружена	Не обнаружены*

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 2-Lyo	+	+	+	+	(мутация в области кодона 526 гена <i>rpoB</i>)	
№ 3-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 511 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	–	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 513 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	не учитывается	–	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	+	+	+	+	Обнаружена (мутация в области кодона 522 гена <i>rpoB</i>)	Не обнаружены*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	+	≤ граничного	≤ граничного	+		
№ 1-Lyo	не учитывается	+	–	≤ граничного	Обнаружена (мутация в области кодона 533 гена <i>rpoB</i>)	Обнаружена (мутация в гене <i>katG</i>)*
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	–		
№ 3-Lyo	–	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	+	+	–	≤ граничного	Обнаружена	Обнаружена мутация

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
№ 2-Lyo	+	+	+	+	(мутация в области кодона 572 гена <i>groB</i>)	(в гене <i>katG</i>)*
№ 3-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	–	+	+	+	Обнаружены (2 мутации в гене <i>groB</i> : S531L и в об- ласти кодона 572)	Обнаружена (мутация в гене <i>katG</i>)*
№ 2-Lyo	+	+	+	не учитывается		
№ 3-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного	≤ граничного		
№ 1-Lyo	–	+	–	–	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	–	–	+	–		
№ 3-Lyo	не учитывается	+	≤ граничного	не учитывается		
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	≤ граничного	> граничного	+	> граничного		
№ 3-Lyo	+	> граничного	≤ граничного	–		
№ 1-Lyo	не учитывается	+	+	не учитывается	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного	–		
№ 3-Lyo	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного	не учитывается		
№ 1-Lyo	–	+	–	–	Недостаточно ДНК МБТ для анализа	
№ 2-Lyo	–	+	+	–		
№ 3-Lyo	не учитывается	+	+	не учитывается		
№ 1-Lyo	–	+	–	–	Невалидный	
№ 2-Lyo	–	–	+	–		
№ 3-Lyo	+	+	–/+	+		

Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ:	
	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5	к рифампицину	к изониазиду
			> граничного			
№ 1-Lyo	+	+	–	–	Невалидный	
№ 2-Lyo	> граничного	> граничного	–	–		
№ 3-Lyo	не учитывается	≤ граничного	–/+	не учитывается		
№ 1-Lyo	–	–	–	–	Ошибка	
№ 2-Lyo	+	≤ граничного	≤ граничного	+		
№ 3-Lyo	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного	не учитывается		
№ 1-Lyo	+	+	–	+	Ошибка	
№ 2-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 3-Lyo	–	–	–	–		
№ 1-Lyo	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного	не учитывается	Ошибка	
№ 2-Lyo	+	+	–	+		
№ 3-Lyo	≤ граничного	≤ граничного	–	≤ граничного		
№ 1-Lyo	–	–	–	–	Ошибка	
№ 2-Lyo	–	–	–	–		
№ 3-Lyo	не учитывается	≤ граничного	≤ граничного	не учитывается		

*возможен один из четырех вариантов для результата выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к изониазиду: мутации не обнаружены, выявлена мутация в гене *katG*, выявлены мутации в гене *katG* и промоторе гена *inhA*, выявлена мутация в промоторе гена *inhA*, связанная с устойчивостью низкого уровня.

Примечание 1: знак «+» в таблице означает, что значение Ct определено, знак «–» означает, что значение Ct отсутствует.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 38 лист об
Директор центра постгеномных технологий ФГБУ
«ЦСТ» ФМБА России



Г.А. Шипулин



Краткое руководство

Набор реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёзного комплекса к рифампицину и изониазиду, методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест МБТ-Резист-I Lyo»

REF K-R044-Lyo-FRT

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

IVD

VER

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

Набор реагентов может быть использован для исследования проб ДНК, полученных в результате экстракции из образцов биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), биоптата (операционного материала), мочи) с помощью зарегистрированного на территории РФ набора реагентов для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК *M. tuberculosis* complex, например, набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838), и содержащие ДНК МБТ в концентрации не менее 5×10^2 ед/мл эквивалентов в 1 мл (ГЭ/мл), а также проб ДНК, полученных экстракцией из культур микобактерий туберкулёза.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ

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

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов два положительных контроля ПЦР (L+ wt и L+ mut) и отрицательный контроль ПЦР (K-) по одному повтору каждого.

- Отобрать необходимое количество цефленовых пакетов с тремя различными лиофилизированными реакционными смесями: **Смесью-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесью-FL МБТ-Р № 2-Lyo, Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo**, для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Каждый цефленовый пакет содержит по два стрипа с одноименной смесью. Для анализа одного образца требуется по одной пробирке из трех стрипов с разными смесями.

ВНИМАНИЕ! Цефленовые пакеты, содержащие Смесью-FL МБТ-Р № 1-Lyo, Смесью-FL МБТ-Р № 2-Lyo и Смесью-FL МБТ-Р № 3-Lyo, необходимо вскрывать непосредственно перед использованием указанных реагентов. Не хранить лиофилизированные смеси после вскрытия цефленовых пакетов!

Внести по 4 мкл* (пропустить этап при использовании для отбора проб ДНК МБТ в концентрации не менее 5×10^2 ГЭ/мл набора реагентов «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838))

ВКО-М	в каждую пробу ДНК (объемом 80 мкл*), экстрагированную из исследуемого образца
-------	--

Внести по 23 мкл

Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в три пробирки с различными реакционными смесями для исследуемых образцов
L+ МБТ-wt	в три пробирки с различными реакционными смесями для L+ wt
L+ МБТ-mut	в три пробирки с различными реакционными смесями для L+ mut

В анализируемую пробу ДНК МБТ внести реагент ВКО-М на этапе подготовки к амплификации, если он не был добавлен в анализируемый образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. Можно изменять объем пробы, но ВКО-М необходимо добавлять пропорционально объему пробы 1:20 (ВКО/проба).

ВНИМАНИЕ! При использовании для отбора проб ДНК МБТ формы 1 набора реагентов «АмплиТест® МБТ» ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838) перед анализом с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» рекомендуется разбавить анализируемую пробу ДНК МБТ РНК-буфером (входящим в состав набора «АмплиТест® МБТ») в 2 раза во избежание быстрого расходования анализируемой пробы и ее нехватки на все последующие тесты.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью сорбционных методов, избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

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

Примеры схем расположения стрипов с готовыми реакционными смесями и внесения в них образцов для постановки амплификации

Вариант 1А (стрипы с реакционными смесями расположены вертикально, поэтому образец вносится в 3 разные смеси по горизонтали, полная загрузка прибора (максимально 29 образцов без учета контролей))

		смесь № 1	смесь № 2	смесь № 3	смесь № 1	смесь № 2	смесь № 3	смесь № 1	смесь № 2	смесь № 3	смесь № 1	смесь № 2	смесь № 3
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A	L+ mut	L+ mut	L+ mut	проба ДНК №1			проба ДНК №2			проба ДНК №3		
2	B	L+ wt	L+ wt	L+ wt	проба ДНК №4			проба ДНК №5			проба ДНК №6		
3	C	проба ДНК №7				...					проба ДНК №10		
4	D	проба ДНК №11				...					проба ДНК №14		
5	E	проба ДНК №15				...					проба ДНК №18		
6	F	проба ДНК №19				...					проба ДНК №22		
7	G	проба ДНК №23				...					проба ДНК №26		
8	H	проба ДНК №27				...		проба ДНК №29			К-	К-	К-

Вариант 1Б (стрипы с реакционными смесями расположены вертикально, поэтому образец вносится в 3 разные смеси по горизонтали, неполная загрузка прибора)

					смесь № 1	смесь № 2	смесь № 3	смесь № 1	смесь № 2	смесь № 3			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A												
2	B				L+ wt	L+ wt	L+ wt	L+ mut	L+ mut	L+ mut			
3	C				проба ДНК №1			проба ДНК №2					
4	D				проба ДНК №3			проба ДНК №4					
5	E				проба ДНК №5			проба ДНК №6					
6	F				проба ДНК №7			проба ДНК №8					
7	G				проба ДНК №9			К-	К-	К-			
8	H												

Примечание: В случае тестирования небольшого количества образцов рекомендуется НЕ располагать образцы в крайних ячейках реакционного модуля амплификатора планшетного типа (по горизонтали А/Н1-12, по вертикали В/С/Д/Е/Ф/Г1 и В/С/Д/Е/Ф/Г12). При полной загрузке прибора планшетного типа рекомендуется располагать в указанных ячейках «L+ mut», «К-» и пробы с концентрацией ДНК МБТ не менее 1×10^4 ГЭ/мл.

вариант 2 (стрипы с реакционными смесями расположены горизонтально, поэтому образец вносится в 3 разные смеси по вертикали, полная загрузка прибора (максимально 13 образцов без учета контролей))

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1	A											
Смесь № 1	2	B		проба	проба	проба			проба	L+ wt	L+ mut		
Смесь № 2	3	C		ДНК	ДНК	ДНК	...		ДНК	L+ wt	L+ mut		
Смесь № 3	4	D		№1	№2	№3			№6	L+ wt	L+ mut		
Смесь № 1	5	E		проба	проба					проба	K-		
Смесь № 2	6	F		ДНК	ДНК	...				ДНК	K-		
Смесь № 3	7	G		№7	№8					№13	K-		
	8	H											

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

При использовании ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную - запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы:

Цикл	Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	15 с		5
	65	30 с		
	72	15 с		
3	95	15 с		40
	65	30 с	FAM, JOE (HEX, VIC), ROX, Cy5	
	72	15 с		

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

Установить стрипованные пробирки в ячейки реакционного модуля прибора так, как показано на схемах выше**. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

* При запуске прибора и обработке результатов вручную допускается менять местами стрипы с реакционными смесями. При использовании ПО «FRT Manager» (автоматический запуск прибора и интерпретация результатов) важно ставить стрипы с реакционными смесями строго по порядку: № 1, 2, 3.

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

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Канал для флуорофора	FAM	JOE (HEX, VIC)	ROX	Cy5
Наименование Смеси-FL МБТ-Р	Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации			
№ 1-Lyo	область кодона 531 гена <i>rpoB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 516 гена <i>rpoB</i> (область RRDR) (без мутаций)	мутация S531L в гене <i>rpoB</i> (область RRDR)	область кодона 526 гена <i>rpoB</i> (область RRDR) (без мутаций)
№ 2-Lyo	область кодона 511 гена <i>rpoB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 513 гена <i>rpoB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 522 гена <i>rpoB</i> (область RRDR) (без мутаций)	область кодона 533 гена <i>rpoB</i> (область RRDR) (без мутаций)
№ 3-Lyo	область кодона 315 гена <i>katG</i> (без мутаций)	область кодона 572 гена <i>rpoB</i> (область вне RRDR) (без мутаций)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последовательность)	участок промоторной области гена <i>inhA</i> (без мутаций)

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

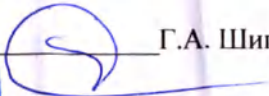
ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки, необходимые для проведения анализа, и граничные значения C_t , необходимые для интерпретации результатов.

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

Копия верна

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 4 листа а

Директор центра постгеномных технологий ФГБУ
«ЦСТ» ФМБА России

 Г.А. Шипулин

