«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель генерального директора по научно-производственной деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

_____ Г.А. Шипулин
«09» _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза к рифампицину и изониазиду, методом полимеразной цепной реакции

«АмплиТест МБТ-Резист-I»

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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 4
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 5
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ 5
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ 5
ПРИНЦИП МЕТОДА 5
КОМПЛЕКТАЦИЯ 7
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 8
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 11
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 16
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 20
СОСТАВ 20
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 21
А. Подготовка проб для амплификации 21
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 23
В. Анализ и интерпретация результатов 25
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 31
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ 33
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 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 туберкулёза
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
К+ МБТ-wt	- положительный контроль ПЦР, включающий фрагменты ДНК МБТ, которые не содержат мутаций, связанных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду (дикого типа)
К+ 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, не содержащий ДНК МБТ
МБТ	- микобактерии туберкулёза, *Mycobacterium tuberculosis complex*
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
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 *rpoB*, связанной с устойчивостью МБТ к рифампицину, и с мутацией S315T1 в гене *katG*, связанной с устойчивостью МБТ к изониазиду
СОП № 3 ПКО ДНК МБТ H37Ra-wt	- стандартный образец предприятия, содержащий ДНК штамма *M.tuberculosis* 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 *rpoB*, 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 *katG*
ТБ	- туберкулёз
УДГ, UDG	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-

	биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
RRDR (область гена *rpoB*)	- Rifampicin Resistance Determining Region – область, определяющая устойчивость к рифампицину, – участок гена *rpoB* длиной 81 п.о., включающий кодоны 507-533 (общепринятая нумерация по *E.coli*), что соответствует кодонам 426-452 в *M. tuberculo*sis, мутации в которых связаны с устойчивостью МБТ к рифампицину

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза к рифампицину и изониазиду, методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест МБТ-Резист-I» (далее – набор реагентов «АмплиТест МБТ-Резист-I») предназначен для выявления в качественном формате мутаций в ДНК микобактерий туберкулёза (МБТ, *Mycobacterium tuberculosis complex*), связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину (в области RRDR и кодоне 572 гена *rpoB*) 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)) 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 и содержащие ДНК МБТ в концентрации не менее $1x10^3$ геномных эквивалентов в 1 мл (ГЭ/мл), которая была определена с помощью зарегистрированного на территории РФ набора реагентов для выделения и обнаружения ДНК МБТ, 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.

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.

---

[1] ВКО добавляется на этапе подготовки к амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

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 *rpoB*). Такой подход позволяет выявлять максимальный спектр целевых мутаций, в первую очередь в области RRDR гена *rpoB*. 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 *rpoB*, область кодона 572 гена *rpoB*, область кодона 315 гена *katG* и участок промоторной области гена *inhA* (включающий позиции -8 и -15). Дополнительно используется один олигонуклеотидный зонд, комплементарный участку гена *rpoB,* содержащему доминирующую по распространенности мутацию S531L (этот дополнительный зонд входит в состав ПЦР-смеси-FL МБТ-Р № 1, его сигнал регистрируется по каналу для флуорофора ROX).

Выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину (в гене *rpoB*) 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 *rpoB*, в третьей пробирке – мутации в кодоне 315 гена *katG*, участке промоторной области гена *inhA,* кодоне 572 гена *rpoB* 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**	**ROX**	**Cy5**
Наименование ПЦР-смеси-FL	**Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)**			
МБТ-Р № 1	область RRDR гена *rpoB* (дикого типа)		мутация S531L в области RRDR гена *rpoB*	область RRDR гена *rpoB* (дикого типа)
МБТ-Р № 2	область RRDR гена *rpoB* (дикого типа)			
МБТ-Р № 3	участок гена *katG* (область кодона 315) (дикого типа)	участок гена *rpoB* вне RRDR (область кодона 572) (дикого типа)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последова-тельность)	участок промоторной области гена *inhA* (дикого типа)

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

КОМПЛЕКТАЦИЯ

В состав набора входит:

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК МБТ (фрагментов генов *rpoB*, *katG*, промоторной области *inhA*) и выявления мутаций,

ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет определять ДНК в качественном формате.

Эксплуатационная документация: инструкция по применению (1 шт.), паспорт качества (1 шт.), вкладыш к набору реагентов (1 шт.), краткое руководство по применению (1 шт.).

Набор реагентов рассчитан на проведение 150 реакций амплификации (всего 50 тестов), 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»

Вид исследуемого материала	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца биологического материала (мокроты, БАЛ, биоптата)	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	$1x10^3$

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 *rpoB* 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 *rpoB*» (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 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» 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. 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» подразумевает использование не предобработанных 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, а следовательно, не подвержен и влиянию интерферирующих веществ.

Для пробоподготовки образцов перед тестированием с помощью набора реагентов «АмплиТест МБТ-Резист-I» рекомендуются к применению только зарегистрированные в РФ наборы реагентов для экстракции нуклеиновых кислот.

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 подготовки к амплификации с детекцией в режиме «реального времени». 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 $1x10^3$ ГЭ/мл, в качестве отрицательных модельных образцов было использовано разведение СОП № 1 ПКО ДНК МБТ-wt в концентрации $1x10^3$ 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»

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 ($1x10^3$ ГЭ/мл) – положительные образцы	6	100	12	100	12	100	18	100
СОП № 1 ПКО ДНК МБТ-wt ($1x10^3$ ГЭ/мл) – отрицательные образцы	6	100	12	100	12	100	18	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические показатели набора реагентов с доверительной вероятностью 95 % определены на основании результатов клинических испытаний с использованием 200 проб ДНК, полученных экстракцией из образцов разного вида биологического материала (мокроты, БАЛ, биоптата

(операционного материала)) от пациентов с туберкулёзом легких и содержащих ДНК МБТ в концентрации не менее $1x10^3$ ГЭ/мл, которая была определена с помощью набора реагентов для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Амплитуб-РВ» по ТУ 9398-001-46395995-2008 (ООО «Синтол», Россия; РУ № ФСР 2010/07635), а также с использованием 100 проб ДНК, полученных экстракцией из образцов культур микобактерий туберкулёза. В качестве набора сравнения был использован набор реагентов для определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулезного комплекса к рифампицину и изониазиду методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Амплитуб-МЛУ-РВ» по ТУ 9398-002-46395995-2008 (ООО "Синтол", Россия; РУ № ФСР 2010/07636). При выявлении мутаций, не определяемых набором сравнения, соответствующие пробы ДНК были дополнительно исследованы с помощью секвенирования по Сэнгеру фрагментов анализируемых генов.

Результаты клинических испытаний набора реагентов представлены в табл. 4.

Таблица 4 — Результаты оценки диагностических показателей набора реагентов «АмплиТест МБТ-Резист-I» и 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 матерала)) (N=200)	Рифам-пицин	**Обнаружены мутации (положительные)**	99	0
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	101
	Изони-азид	**Обнаружены мутации (положительные)**	122	0
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	78
Проба ДНК, полученная	Рифам-пицин	**Обнаружены мутации**	50	0

экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулёза (N=100)		**(положительные)**		
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	50
	Изони-азид	**Обнаружены мутации (положительные)**	53	0
		Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	47

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

Вид исследуемого материала (общее количество образцов)	**Выявление мутаций, связанных с устойчи-востью**	**Диагностическая чувствительность[2] (с доверительной вероятностью 95 %)**	**Диагностическая специфичность[3], (с доверительной вероятностью 95 %)**
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала) (N=200)	к рифампицину	96,34-100 %	96,41-100 %
	к изониазиду	97,02-100 %	95,38-100 %
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулёза (N=100)	к рифампицину	92,89-100 %	92,89-100 %
	к изониазиду	93,28-100 %	92,45-100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИ-ЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-

[2] Диагностическая чувствительность относительно использованного набора сравнения.
[3] Диагностическая специфичность относительно использованного набора сравнения.

эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от плюс 20 до плюс 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[4], 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

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

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 клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались

условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортирования, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

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

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

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплектом» FRT-50 F:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) для приготовления реакционных смесей;

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл

с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) – при использовании прибора роторного типа.

2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axygen, 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 (например, ООО «Биохит», Россия).
7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)).
8. Программное обеспечение для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870).
9. Холодильник от плюс 2 до плюс 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования с помощью набора реагентов «АмплиТест МБТ-Резист-I» являются пробы ДНК, полученные в результате экстракции из образцов биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, биоптата (операционного материала)) и содержащие ДНК МБТ в концентрации не менее $1x10^3$ 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 завинчивающиеся емкости из полипропилена объемом 20-100 мл с широким горлом. После этого образцы подвергают предварительной обработке 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)», например, с помощью реагента для пробоподготовки и деконтаминации мокроты «BBL Mycoprep Kit» (Becton, Dickinson and Company («Бектон Дикинсон энд Компани»), США; РУ № ФСЗ 2009/04403), с получением осадков («единых проб») и/или с помощью инактивирующих реагентов, предназначенных для проведения молекулярно-генетических исследований и зарегистрированных на территории РФ (например, реагента для предобработки образцов, предположительно содержащих ДНК микобактерий «Амплитуб-Преп» (ООО «Синтол», Россия; РУ № РЗН 2017/6634), далее – реагент «Амплитуб-Преп»)), в соответствии с инструкциями по их применению.

Полученные деконтаминированные осадки («единые пробы») пригодны для исследований как микробиологическими, так и молекулярно-генетическими методами. Образцы, прошедшие обработку инактивирующим реагентом, пригодны только для молекулярно-генетических исследований.

Образцы культур микобактерий туберкулеза – для исследования с помощью набора реагентов «АмплиТест МБТ-Резист-I» – подвергают предварительной обработке только с помощью инактивирующих реагентов, предназначенных для

проведения молекулярно-генетических исследований и зарегистрированных на территории РФ (например, реагента «Амплитуб-Преп» (ООО «Синтол», Россия; РУ № РЗН 2017/6634)), в соответствии с инструкциями по их применению.

Последующую экстракцию нуклеиновых кислот из исследуемых предварительно обработанных образцов и обнаружение в них ДНК МБТ с ее количественной оценкой выполняют с использованием наборов реагентов для диагностики туберкулёза молекулярно-генетическими методами исследования, зарегистрированных на территории РФ (например, набора реагентов для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия; РУ № ФСР 2010/07635)), в соответствии с инструкциями по их применению.

Пробы ДНК получают и хранят в виде растворов в завинчивающихся или плотно закрывающихся полипропиленовых пробирках объемом 1,5 мл (например, Axygen, 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 хладоэлементы.

ВНИМАНИЕ! Объем пробы ДНК МБТ (после экстракции), предназначенной для исследования, должен быть не менее **30 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 $1x10^8$ ГЭ/мл, перед проведением амплификации рекомендуется разводить до $1x10^7$ 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.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК МБТ (фрагментов генов *rpoB*, *katG*, промоторной области *inhA*) и выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Часть 1			
ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 1	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 3	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
К+ МБТ-wt	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
К+ МБТ-mut	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Часть 2			
ПЦР-буфер-М	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
TaqF полимераза (UDG)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка

Эксплуатационная документация: инструкция по применению (1 шт.), паспорт качества (1 шт.), вкладыш к набору реагентов (1 шт.), краткое руководство по применению (1 шт.).

Комплект реагентов рассчитан на проведение 150 реакций

амплификации (всего 50 тестов), включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы раздельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от плюс 2 до плюс 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требуемое для приготовления трех реакционных смесей. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL МБТ-Р № 1** или **МБТ-Р № 2**, или **МБТ-Р № 3**, **5 мкл ПЦР-буфера-М** и **0,5 мкл TaqF полимеразы (UDG)**. Смеси готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 8) плюс запас на одну реакцию.

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

ВНИМАНИЕ! TaqF полимеразу (UDG) необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционных смесей и убирать в морозильную камеру сразу же после добавления в реакционные смеси.

2. Перемешать содержимое пробирок с указанными **ПЦР-смесями-FL, ПЦР-буфером-М, TaqF полимеразой (UDG)**, осадить капли на вортексе.
3. В трех отдельных пробирках подготовить три реакционные

смеси. Внести необходимое количество **ПЦР-смеси-FL МБТ-Р № 1 или МБТ-Р № 2, или МБТ-Р № 3, ПЦР-буфера-М и TaqF полимеразы (UDG)**, перемешать и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое (трехкратное) количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб, поставить в три ряда.
5. В каждый ряд пробирок внести по **15 мкл** одной из трех приготовленных реакционных смесей. При работе со стрипами рекомендуется вносить приготовленные реакционные смеси определенным образом по одному из предложенных вариантов:
   Вариант 1 (расположение 3 разных смесей для одного образца по горизонтали): при полной загрузке прибора в первый, четвертый, седьмой и десятый вертикально расположенные стрипы – смесь **№ 1**; во второй, пятый, восьмой и одиннадцатый стрипы – смесь **№ 2**; в третий, шестой, девятый и двенадцатый стрипы – смесь **№ 3**.
   Вариант 2 (расположение 3 разных смесей для одного образца по вертикали): в ячейки B3-10 и E3-10 горизонтально расположенных стрипов – смесь **№ 1**; в ячейки C3-10 и F3-10 – смесь **№ 2**; в ячейки D3-10 и G3-10 – смесь **№ 3**.
   Неиспользованные остатки реакционных смесей утилизировать.
6. До внесения проб ДНК в пробирки с реакционными смесями однократно внести в каждую пробу ДНК (объемом от 30 до 90 мкл, желательно 45 мкл) по **5 мкл ВКО-М**, 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.
7. В три пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Объем экстрагированной пробы ДНК МБТ, предназначенной для исследования, должен быть не менее **30 мкл**.

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

8. Поставить контрольные реакции:

а) **положительный контроль ПЦР (К+ wt)** – в три пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К+ МБТ-wt**;

б) **положительный контроль ПЦР (К+ mut)** – в три пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К+ МБТ-mut**;

в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в три пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К–**;

г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в три пробирки с различными реакционными смесями внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО (ОК не является обязательным контролем).

ВНИМАНИЕ! В случае тестирования на приборах планшетного типа 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 максимального количества образцов (при полной загрузке прибора) в указанные крайние ячейки рекомендуется вносить **К+ МБТ-mut**, **К–** и пробы в концентрации ДНК МБТ не менее $1x10^4$ 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 к указанному ПО и методическим рекомендациям по проведению амплификации и анализу результатов при помощи ПО «FRT Manager».

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

Таблица 6 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[5] и планшетного[6] 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		40
	65	30 с	**FAM, JOE, ROX, Cy5**	
	72	15 с		

2. Установить 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**, затем – со смесью **№ 3**. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки прибора планшетного типа (тестирования небольшого количества образцов) рекомендуется НЕ располагать образцы в крайних ячейках реакционного модуля амплификатора. В этом случае рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или

[5] Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q (QIAGEN).
[6] CFX96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК-Технология).

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 ПЦР-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, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов.

Принципы интерпретации результатов следующие:

1. Устойчивость 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, Cy5, и отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1**,
- определены значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 2**,
- определено значение *Ct* по каналу для флуорофора JOE в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**.

При этом значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** (детекция ВКО) не учитывается, т.к. в этом случае область RRDR гена *rpoB* 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, Cy5 и/или определено значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1**,
- отсутствует значение *Ct* по одному или нескольким каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 2**,
- отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора JOE в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**.

ВНИМАНИЕ! Если для данной пробы отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1**, то допустимо отсутствие *Ct* еще не более чем по четырем каналам (из перечисленных выше) суммарно для всех трех ПЦР-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 с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** (детекция ВКО) должно быть меньше или равно граничному.

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

2. Устойчивость 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 с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**.

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 с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** 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 с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** (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 с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**.

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 и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1**; FAM, JOE, ROX и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 2** и JOE в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**, – и определено значение *Ct* меньше или равное граничному в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** по каналу для флуорофора ROX (детекция ВКО);

- отсутствуют значения *Ct* по одному или нескольким каналам, и значения *Ct* превышают граничные по четырем каналам для флуорофоров из перечисленных далее: FAM, JOE и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1**; FAM, JOE, ROX и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 2** и JOE в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**, – и определено значение *Ct* меньше или равное граничному в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** по каналу для флуорофора ROX (детекция ВКО);
- отсутствуют значения *Ct* одновременно по всем четырем каналам в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1** и/или с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 2,** а присутствующие значения *Ct* по всем каналам в остальных пробирках превышают граничные, кроме значения *Ct* в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** 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 *Ct* отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора ROX в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** (детекция ВКО), и отсутствуют значения *Ct* одновременно по пяти или более каналам из перечисленных далее: FAM, JOE и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1**; FAM, JOE, ROX и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 2** и JOE в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**.
- значение Ct отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора ROX в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** (детекция ВКО), и отсутствуют значения *Ct* по одному или нескольким другим каналам, и значения *Ct* превышают граничные по четырем каналам из перечисленных далее: FAM, JOE и Cy5 в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 1**; FAM, JOE, ROX и Cy5 в пробирке с

ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 2 и JOE в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3**.

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 (*Ct*) одновременно по всем четырем каналам в одной или нескольких пробирках с ПЦР-смесями-FL, при этом выполняется одно из следующих условий:

- присутствующие значения *Ct* (все или некоторые) не превышают граничных значений;
- значение *Ct* отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора ROX в пробирке с **ПЦР-смесью-FL МБТ-Р № 3** (детекция ВКО).

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

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

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 ПЦР-смеси-FL	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)			
			FAM	JOE	ROX	Cy5
МБТ-Р № 1	К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
МБТ-Р № 2			отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
МБТ-Р № 3			отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
МБТ-Р № 1	К+ wt	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	отсутствует	определено меньше граничного
МБТ-Р № 2			определено	определено	определено	определено

			меньше граничного	меньше граничного	меньше граничного	меньше граничного
МБТ-Р № 3			определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного
МБТ-Р № 1	K+ mut	ПЦР	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	отсутствует
МБТ-Р № 2			определено меньше граничного	отсутствует	определено меньше граничного	не учитывается
МБТ-Р № 3			отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	отсутствует
МБТ-Р № 1	ОК	Экстракция ДНК и ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
МБТ-Р № 2			отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
МБТ-Р № 3			отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+ wt) значение порогового цикла (*Ct*) 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 (K+ mut) значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение по каналам, где оно должно быть определено меньше граничного согласно таблице 7 или определено значение порогового цикла (*Ct*) 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 (*Ct*) 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 отрицательного контроля экстракции (ОК) определено значение порогового цикла (*Ct*) по одному или нескольким каналам, где оно должно отсутствовать согласно таблице 7. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (*Ct*), 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. 15 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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

Набор реагентов при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Часть 1 в составе реагентов ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 1, ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 2, ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 3, К+ МБТ-wt, К+ МБТ-mut, ВКО-М хранить в холодильной камере при

температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 1, ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 2, ПЦР-смесь-FL МБТ-Р № 3 хранить в защищенном от света месте.

Часть 2 в составе ПЦР-буфера-М, TaqF полимеразы (UDG), К– хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

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

REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии	Σ	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления
	Беречь от влаги		