УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 10.04.12 № 1679-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

_____ В.И.Покровский

«06» декабря 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для дифференцирования микобактерий туберкулеза (*M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.bovis* BCG) в клиническом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *MTC*-diff-FL»

АмплиСенс®

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ФОРМАТ FRT 9
СОСТАВ 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 9
А. Подготовка пробирок для амплификации 9
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 10
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 12
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 18
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 19

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхо-альвеолярный лаваж
ВКО	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
МБТ (*МТС*)	- микобактерии туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*)
м.т.	- микробные тела
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПВБ	- промывные воды бронхов
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
PBS	- фосфатно-солевой буфер
UDG	- урацил-ДНК-гликозилаза

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс®** ***MTC*-diff-FL»** предназначен для дифференцирования видов микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (*МТС*) – человеческого (*M.tuberculosis*) и бычьего (*M.bovis*), а также вакцинного штамма (*M.bovis* BCG) – в клиническом материале и культурах микроорганизмов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Для анализа следует использовать образцы ДНК, экстрагированной из клинического материала или культур микроорганизмов, в которых на этапе обнаружения и/или количественного определения *Mycobacterium tuberculosis complex* были получены положительные результаты.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания[1].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Дифференцирование ДНК микобактерий туберкулеза, экстрагированной из образцов клинического материала или культур микроорганизмов, проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в формате «мультипрайм» с одновременной амплификацией четырех фрагментов ДНК, три из которых являются специфическими мишенями, детерминирующими один из видов

[1] В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Mycobacterium tuberculosis complex: *M.tuberculosis*, *M.bovis* или *M.bovis* BCG, четвертая – внутренним контрольным образцом (ВКО). В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Гибридизационно-флуоресцентная детекция сигналов продуктов амплификации осуществляется непосредственно в процессе ПЦР с помощью амплификатора в режиме «реального времени».

Гибридизационно-флуоресцентная детекция ДНК микобактерий человеческого вида (*M.tuberculosis*) проводится по каналу FAM[2], ДНК микобактерий бычьего вида (*M.bovis* или *M.bovis* BCG) – по каналу JOE[2], только вакцинного штамма (*M.bovis* BCG) – по каналу ROX[2], ВКО – по каналу Cy5[2].

«ПЦР-комплект», входящий в состав данного набора реагентов, содержит фермент UDG для снижения риска возможной контаминации продуктами амплификации ПЦР-лаборатории.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК видов *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ВНИМАНИЕ! Набор реагентов предназначен для работы с ранее экстрагированной ДНК, полученной при использовании комплектов реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или «ДНК-сорб-С» для экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов разных видов материалов производства ФБУН ЦНИИ

[2] Или аналогичному по названию каналу детекции в зависимости от используемого прибора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для выделения ДНК	Аналитическая чувствительность, м.т./мл			
		«АмплиСенс® *MTC*-FL»	АмплиСенс® *MTC*-diff-FL»	«АмплиСенс® *MTC*-FL»	АмплиСенс® *MTC*-diff-FL»
		M.tuberculosis **(штамм H37 Ra)**		***M.bovis*** **BCG (штамм *M.bovis* BCG)**	
PBS-буфер	«РИБО-преп»	$5x10^2$	$1x10^3$	$1x10^3$	$1x10^3$
Моча		$1x10^3$	$5x10^3$	$1x10^3$	$1x10^3$
Мокрота[3], БАЛ/ПВБ		$5x10^2$	$1x10^3$	$1x10^3$	$1x10^3$
PBS-буфер	«ДНК-сорб-В»	$5x10^2$	$1x10^3$	$1x10^3$	$1x10^3$
Мокрота[3], БАЛ/ПВБ		$5x10^2$	$5x10^3$	$1x10^3$	$5x10^3$
Моча		$1x10^3$	$5x10^3$	$1x10^3$	$5x10^3$
10 % гомогенат разных видов тканей	«ДНК-сорб-С»	$1x10^2$	$1x10^3$	$5x10^2$	$1x10^3$

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность оценивалась как при тестировании штаммов микобактерий входящих в группу *M.tuberculosis complex*, так и нетуберкулезных микобактерий, а также штаммов микроорганизмов, вызывающих заболевания сходных локализаций.

Для определения аналитической специфичности на штаммах различных микроорганизмов (в концентрации не менее чем $5x10^8$ м.т./мл), тестировали 116 контрольных штаммов или клинических изолятов. Из них 5 входили в состав *M.tuberculosis complex,* 31 являлись нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), 80 принадлежали к другим родам и семействам. Специфичность тест-системы оценивалась по отсутствию положительного результата амплификации ДНК бактерий, не принадлежащих к *M.tuberculosis complex*, а также по наличию положительного результата по соответствующему каналу детекции для дифференцирования видов микобактерий туберкулезного комплекса.

[3] Концентрация в 1 мл мокроты, обработанной реагентом для предобработки слизистого материала «МУКОЛИЗИН».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перечень референтных видов:

- Микобактерии, принадлежащие *Mycobacterium tuberculosis complex*: *M.tuberculosis, M.bovis, M.bovis BCG-1*и др.
- Нетуберкулезные микобактерии: *M.avium, M.paratuberculosis, M.xenopi, M.gordonae, M.ulcerans, M.phlei, M.intracellulare, M.kansasii, M.fortuitum.*
- Бактерии, принадлежащие к другим родам и семействам: *Brucella, Campylobacter, Chlamydophila, Cryptococuss, Enterobacter, Enterococcus, E.coli, Klebsiella, Listeria, Moraxella, Neisseria, Pantoea, Pasteurella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus.*

Результаты тестирования показали 100% специфичность.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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 в лабораториях противотуберкулезных учреждений следует дополнительно руководствоваться требованиями Приказа № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (Приложение №11).

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 2

Для проведения амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов реакции требуются:

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 (200) мкл.
5. Штативы для наконечников и пробирок на 0,2 мл.
6. 2 холодильника от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для раздельного хранения образцов ДНК и реагентов.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
9. Персональный компьютер для работы с амплификатором.
10. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(Bio-Rad, США), Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и SmartCyclerII в комплекте со специальной центрифугой Mini-Spin (Cepheid, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

11. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл для приборов формата ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene для постановки в ротор на 36 пробирок) или с куполообразной крышкой на 0,2 мл для приборов формата ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через крышку (например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3005, «ДТ-96» и др.) или специальные реакционные модули для прибора SmartCycler II.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК видов *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *MTC*-diff	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
Фермент UDG	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК *MTC*-diff / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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.

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (два контроля амплификации).
2. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь из расчета по **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL *MTC*-diff, 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,5 мкл фермента UDG** на одну реакцию. Полученную реакционную смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
3. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. Подготовить пробирки с экстрагированной ДНК, в которых ранее была обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* с помощью набора реагентов **«АмплиСенс® *MTC*-FL»**. В случае хранения пробирок, их необходимо встряхнуть на вортексе, а затем центрифугировать при 10 тыс g в течение 2 мин.
5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**. При добавлении ДНК-проб необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь (в случае использования для экстракции ДНК сорбентных методик).

ВНИМАНИЕ! Для исследования пригодна ранее полученная ДНК при условии ее хранения в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, любого срока хранения при температуре не выше минус 68 °С.

6. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *MTC*-diff / STI**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

ВНИМАНИЕ! Для проведения деконтаминации реакционной смеси инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-анализа пробирки 10–30 мин при комнатной температуре.

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

Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени») для выполнения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5, 6).

ВНИМАНИЕ! Программа амплификации «95-65-72 МТС» универсальна для всей линейки наборов детекции микобактерий туберкулеза, поэтому при постановке в одном приборе можно проводить как обнаружение, так и дифференцирование до вида МБТ.

ВНИМАНИЕ! При работе с приборами Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) лунка №1 ротора обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой из текущего эксперимента. Если в один ротор загружаются пробирки с образцами, анализируемыми с помощью разных наборов реагентов линейки диагностики туберкулеза, то порядок расстановки пробирок следующий: пробирки с реагентами для дифференцирования, затем для количественного определения и в последнюю очередь для обнаружения *Mycobacterium tuberculosis complex*.

Таблица 5

Программа амплификации «95-65-72 МТС» для приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия)

Цикл	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
Удержание температуры	95	15 мин	–	1
Циклирование	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
Циклирование 2	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5[4]	
	72	15 с	–	

[4] Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 6

Программа амплификации «95-65-72 МТС» для прибора SmartCycler (Cepheid, США)

Температура, °С	*Время*	*Кол-во циклов*
95	900 с	1
95	20 с	45
65	50 с	
72	20 с	

Порядок программирования приборов см. в **методических рекомендациях** по применению набора реагентов для дифференцирования микобактерий туберкулеза (*M.tuberculosis, M.bovis* и *M.bovis* BCG) в клиническом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *MTC*-diff-FL».

По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам – анализируются и интерпретируются после окончания работы амплификатора с помощью программного обеспечения прибора, используя установки, указанные во **вкладыше**, прилагаемом к ПЦР-комплекту, и **методических рекомендаций** по применению набора реагентов для дифференцирования микобактерий туберкулеза (*M.tuberculosis, M.bovis* и *M.bovis* BCG) в клиническом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *MTC*-diff-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct (Cp)* в соответствующей графе в таблице результатов. Граничные значения *Ct* для конкретного прибора указаны во вкладыше, прилагаемом к «ПЦР-комплекту».

Результат амплификации по каналу считается **положительным (+)**, если кривая флуоресценции имеет типичную для ПЦР в режиме «реального времени» S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, и значение порогового

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цикла *Ct (Cp)* для данного канала менее или равно указанному; **сомнительным (> Ct)** – в случае, если значение порогового цикла больше указанного; **отрицательным (–)** – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения *Ct (Cp)*. **Невалидный** результат по каналу формируется из совокупности отрицательного значения по этому каналу, и отрицательного или сомнительного результата по каналу Cy5, который воспроизвелся при повторном анализе пробы.

Положительный результат по каналу **FAM**[5] свидетельствует о наличии в образце ДНК микобактерий туберкулеза человеческого вида (***M.tuberculosis***), по каналу **JOE**[5], – ДНК микобактерий туберкулеза бычьего вида (***M.bovis*** и ***M.bovis* BCG**), по каналу **ROX**[5]– ДНК вакцинного штамма микобактерий туберкулеза бычьего вида (***M.bovis* BCG**), по каналу **Cy5**[5] – об адекватном прохождении этапов экстракции и амплификации ВКО.

ВНИМАНИЕ! Интерпретация результатов дифференцирования видов *M.tuberculosis complex* осуществляется независимо по каждому из каналов. Набор реагентов позволяет выявлять указанные виды *M.tuberculosis complex* в смесях (например, смесь *M.tuberculosis* и *M.bovis* или *M.tuberculosis* и *M.bovis* BCG). Исключение составляет смесь *M.bovis* и *M.bovis* BCG, что связано с принадлежностью вакцинного штамма *M.bovis* BCG к бычьему виду МБТ (*M.bovis*).

Оценка результатов анализа контрольных точек

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации, в соответствии с табл. 7.

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение Ct по каналу				Результат
		FAM	JOE	ROX	Cy5	
К–	ПЦР	–	–	–	–	отрицательный
К+	ПЦР	+	+	+	+	положительный

[5] Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Результаты не подлежат учету в случае:

- отсутствия положительного сигнала по одному – четырем каналам детекции в пробе с положительным контролем ПЦР (К+). В этом случае требуется повторная амплификация положительного контроля ПЦР (К+). При повторном получении аналогичного результата, набор реагентов не подлежит дальнейшему использованию.
- наличия положительного сигнала по одному – четырем каналам детекции в отрицательном контроле ПЦР (К–). В этом случае необходимо повторить исследование не менее, чем 5 образцов отрицательного контроля ПЦР (К–). При повторном получении аналогичного результата хотя бы в одном из образцов, набор реагентов не подлежит дальнейшему использованию.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Интерпретация результатов исследуемых клинических образцов или культур микроорганизмов

Таблица 8

Интерпретация результатов исследуемых образцов

ДНК	FAM	JOE	ROX	Cy5	Результат	Форма ответа, вносимого в бланк результатов исследования
M.tuberculosis	+	Любое значение[6]	Любое значение	+/–	Обнаружена	ДНК *M.tuberculosis* (человеческий вид) обнаружена
	–	Любое значение	Любое значение	+	Не обнаружена	ДНК *M.tuberculosis* (человеческий вид) не обнаружена
	>*Ct*	Любое значение	Любое значение	+	Сомнительный	Обнаружение ДНК *M.tuberculosis* (человеческий вид) сомнительно. Рекомендуется повторное взятие и исследование материала
	–/>*Ct*	Любое значение	Любое значение	–/>*Ct*	Невалидный	Обнаружение ДНК *M.tuberculosis* (человеческий вид) – результат невалидный. Рекомендуется повторное взятие и исследование материала
M.bovis	Любое значение	+	–	+/–	Обнаружена	ДНК *M.bovis* (бычий вид) обнаружена
	Любое значение	–	Любое значение	+	Не обнаружена	ДНК *M.bovis* (бычий вид) не обнаружена
	Любое значение	>*Ct*	–	+	Сомнительный	Обнаружение ДНК *M.bovis* сомнительно. Рекомендуется повторное взятие и исследование материала
	Любое значение	–/>*Ct*	Любое значение	–/>*Ct*	Невалидный	Обнаружение ДНК *M.bovis* (бычий вид) – результат невалидный. Рекомендуется повторное взятие и исследование материала
M.bovis BCG	Любое значение	Любое значение	+	+/–	Обнаружена	ДНК *M.bovis* BCG (вакцинный штамм) обнаружена
	Любое значение	+/–	–	+	Не обнаружена	ДНК *M.bovis* BCG (вакцинный штамм) не обнаружена

[6] Любое значение – возможен любой результат исследования: положительный (+), отрицательный (–) или сомнительный (>Ct).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Любое значение	**Любое значение**	***>Ct***	**+**	**Сомнительный**	Обнаружение ДНК *M.bovis* BCG (вакцинный штамм) сомнительно. Рекомендуется повторное взятие и исследование материала
	Любое значение	**Любое значение**	***–/>Ct***	***–/>Ct***	**Невалидный**	Обнаружение ДНК *M.bovis* BCG (вакцинный штамм) – результат невалидный. Рекомендуется повторное взятие и исследование материала

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

ВНИМАНИЕ! Интерпретация результатов дифференцирования видов *M.tuberculosis complex* осуществляется независимо по каждому из каналов.

Принцип интерпретации результатов

Получение:

1. положительного результата по одному из каналов FAM, JOE или ROX и положительного или отрицательного результата по каналу Cy5 свидетельствует об **обнаружении** в исследуемом образце *M.tuberculosis, M.bovis* или *M.bovis* BCG, соответственно. При обнаружении вакцинного штамма *M.bovis* BCG по каналу JOE также может регистрироваться положительный сигнал.
2. отрицательного результата по одному из каналов FAM, JOE или ROX и положительного результата по каналу Cy5 свидетельствует об **отсутствии** в исследуемом образце *M.tuberculosis*, *M.bovis* или *M.bovis* BCG, соответственно;
3. положительного результата по нескольким каналам: FAM, JOE и ROX свидетельствует об обнаружении смеси разных видов *M.tuberculosis complex.* Исключение составляет сочетание положительных сигналов по каналам JOE и ROX, свидетельствующее об обнаружении в исследуемом образце *M.bovis* BCG. Поэтому, если в образце находится смесь *M.bovis* BCG и *M.bovis,* то ее присутствие не выявляется и образец определяется как *M.bovis* BCG.
4. сомнительного результата (*>Ct*) по одному из каналов FAM, JOE или ROX и положительного результата по каналу Cy5 требует повторной амплификации пробы ДНК. Если значимый результат не получен, то проводится повторная экстракция и амплификация ДНК из исходного образца. Получение аналогичного результата (>Ct) интерпретируется как **сомнительный**.
5. отрицательного или сомнительного результатов по каналам FAM, JOE и ROX и отрицательного или сомнительного результатов по каналу Cy5 свидетельствует о невалидном результате. В этом случае требуется повторная амплификация

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

образца. Если валидный результат не получен, то проводится повторная экстракция и амплификация ДНК из исходного образца. Получение аналогичного результата (–/>*Ct*) интерпретируется как **невалидный**.

Валидность результатов по каждому из каналов оценивается независимо.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *MTC*-diff, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF) и фермент UDG хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *MTC*-diff хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *MTC*-diff-FL»** направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)[7].

Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Директор ФГУ «СПб НИИФ»

Минздравсоцразвития России П.К.Яблонский

[7] Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
LOT	Код партии	Σ	Максимальное число тестов
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru