

«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)



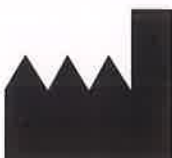
Г.А. Шипулин

«17» декабря 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

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

«АмплиТест® МБТ-Резист-II»



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	4
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	4
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ	5
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА	8
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала	12
Воспроизводимость	13
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	13
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	18
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	21
А. Подготовка проб для амплификации	21
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	30
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	31
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	32
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 – Интерпретация результатов для исследуемых образцов в некоторых наиболее распространенных частных случаях	33

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
К+ МБТ-ФХ-А, L+ МБТ-ФХ-А	- положительный контроль ПЦР, включающий фрагменты ДНК МБТ, которые содержат мутации в <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i> , связанные с устойчивостью к фторхинолонам
К+ МБТ-ФХ-В, L+ МБТ-ФХ-В	- положительный контроль ПЦР, включающий фрагменты ДНК МБТ, которые содержат другие мутации в <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i> , связанные с устойчивостью к фторхинолонам
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 № 3 ПКО ДНК МБТ H37Ra-wt	- стандартный образец предприятия, содержащий ДНК штамма <i>M. tuberculosis</i> H37Ra (без мутаций в анализируемых генах)
СОП № 49 ПКО ДНК МБТ mut-1 FQ	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями G88C, S91P, D94G в гене <i>gyrA</i> и D461N, E501D в гене <i>gyrB</i> , связанными с устойчивостью МБТ к фторхинолонам
СОП № 50 ПКО ДНК МБТ mut-2 FQ	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями A90V, D94N в гене <i>gyrA</i> и D461N в гене <i>gyrB</i> , связанными с устойчивостью МБТ к фторхинолонам
СОП № 51 ПКО ДНК МБТ mut-3 FQ	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями G88A, D94N в гене <i>gyrA</i> и D461N в гене <i>gyrB</i> , связанными с устойчивостью МБТ к фторхинолонам
СОП № 52 ПКО ДНК МБТ mut-4 FQ	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями D94Y в гене <i>gyrA</i> и D461N в гене <i>gyrB</i> , связанными с устойчивостью МБТ к фторхинолонам
СОП № 53 ПКО ДНК МБТ mut-5 FQ	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями D94A в гене <i>gyrA</i> и D461N в гене <i>gyrB</i> , связанными с устойчивостью МБТ к фторхинолонам
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»
QRDRs (области генов <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i>)	- Quinolone Resistance-Determining Regions (QRDRs) – области, определяющие устойчивость к фторхинолонам, – участок гена <i>gyrA</i> , включающий кодоны 74-113, и участок гена <i>gyrB</i> , включающий кодоны 461-499 (500-538), мутации в которых связаны с устойчивостью МБТ к фторхинолонам

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза к фторхинолонам, методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® МБТ-Резист-II» (далее – набор реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-II», 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 фторхинолонам (в генах *gyrA* и *gyrB*), 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 в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – лабораторная диагностика туберкулёза (ТБ) с лекарственной устойчивостью возбудителя (*Mycobacterium tuberculosis complex*) к фторхинолонам, в том числе ТБ с пред-широкой лекарственной устойчивостью.

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 клинко-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 (*gyrA* и *gyrB*), включающих области расположения анализируемых мутаций, ассоцииро-

ванных с устойчивостью МБТ к фторхинолонам, и ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО)¹ с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать прохождение реакции амплификации.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе каждой реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени МБТ с мутацией, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации за счёт измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени». При использовании указанного подхода нарастание флуоресценции (определение значения порогового цикла (*C_t*)) означает наличие мутации на участке гибридизации зонда, комплементарного ДНК МБТ с соответствующей мутацией.

Набор реагентов позволяет выявлять 9 наиболее распространенных мутаций в кодонах 88, 90, 91, 94 гена *gyrA* и 3 мутации в кодонах 461, 501 гена *gyrB* (см. табл.1), входящих в области, называемые Quinolone Resistance-Determining Regions (QRDRs), мутации в которых определяют устойчивость к фторхинолонам. В наборе предусмотрено выявление мутаций в гене *gyrA* как в отсутствие, так и в присутствии естественного полиморфизма S95T, который не связан с устойчивостью МБТ к фторхинолонам.

Выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к фторхинолонам, для одного образца проводится в четырёх пробирках. В трёх пробирках выявляются мутации в гене *gyrA*, в четвертой пробирке – мутации в гене *gyrB*. Во всех четырёх пробирках также осуществляется детекция ВКО. Результаты амплификации анализируемых фрагментов генов и

¹ ВКО добавляют в анализируемый образец на этапе экстракции 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»)

ДНК ВКО для каждой реакционной смеси регистрируются по четырём различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
Наименование смеси	Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)			
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 1/ Смесь-FL МБТ-ФХ № 1-Lyo	мутация S91P (область гена <i>gyrA</i>)	мутация A90V (область гена <i>gyrA</i>)	ДНК ВКО (искус- ственно синтези- рованная последо- ватель- ность)	мутация G88C (область гена <i>gyrA</i>)
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 2/ Смесь-FL МБТ-ФХ № 2-Lyo	мутация D94H (область гена <i>gyrA</i>)	мутация D94G (область гена <i>gyrA</i>)		мутация D94N (область гена <i>gyrA</i>)
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 3/ Смесь-FL МБТ-ФХ № 3-Lyo	мутация D94A (область гена <i>gyrA</i>)	мутация D94Y (область гена <i>gyrA</i>)		мутация G88A (область гена <i>gyrA</i>)
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 4/ Смесь-FL МБТ-ФХ № 4-Lyo	мутация E501D (область гена <i>gyrB</i>)	мутация D461H (область гена <i>gyrB</i>)		мутация D461N (область гена <i>gyrB</i>)

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счёт применения термолабильного фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ, UDG), входящего в состав ПЦР-буфера-Н, и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознаёт 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

Набор реагентов выпускается в двух формах комплектации.

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-64 L.

Все формы комплектации набора реагентов предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют определять ДНК в качественном формате.

Составной частью формы 1 является «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, который содержит все реагенты в жидком виде и предназначен для использования всех типов рекомендованных амплификаторов.

Составной частью формы 2 является «ПЦР-комплект» вариант FRT-64 L, который содержит четыре разные реакционные смеси в лиофилизированном виде в стрипах по 8 пробирок, различающиеся между собой маркировкой пробирок, и предназначен для приборов только планшетного типа. Каждый стрип содержит реакционную смесь одного вида: Смесь-FL МБТ-ФХ № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 2-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 3-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 4-Lyo. Таким образом, для анализа одного образца требуется по одной пробирке из четырех разных стрипов.

Набор реагентов формы 1 рассчитан на проведение 200 реакций амплификации (анализ 50 образцов), включая контроли.

Набор реагентов формы 2 рассчитан на проведение 256 реакций амплификации (анализ 64 образцов), включая контроли.

КОМПЛЕКТНОСТЬ

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *M. tuberculosis complex* (фрагментов генов *gyrA* и *gyrB*) и выявления мутаций, связанных с устойчивостью *M. tuberculosis complex* к фторхинолонам, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Часть 1			
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 1	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 3	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 4	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Часть 2			
ВКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
К+ МБТ-ФХ-А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
К+ МБТ-ФХ-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка

Набор реагентов рассчитан на проведение 200 реакций амплификации (анализ 50 образцов), включая контроли.

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

«ПЦР-комплект» вариант FRT-64 L – комплект реагентов с лиофилизированными реакционными смесями для амплификации фрагментов ДНК *M. tuberculosis complex* (фрагментов генов *gyrA* и *gyrB*) и выявления мутаций, связанных с устойчи-

востью *M. tuberculosis* complex к фторхинолонам, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объём, мл	Количество
Смесь-FL МБТ-ФХ № 1-Lyo	Гранула белого цвета	—	1 стрип из 8 пробирок x 8
Смесь-FL МБТ-ФХ № 2-Lyo	Гранула белого цвета	—	1 стрип из 8 пробирок x 8
Смесь-FL МБТ-ФХ № 3-Lyo	Гранула белого цвета	—	1 стрип из 8 пробирок x 8
Смесь-FL МБТ-ФХ № 4-Lyo	Гранула белого цвета	—	1 стрип из 8 пробирок x 8
L+ МБТ-ФХ-А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
L+ МБТ-ФХ-В	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 256 реакций амплификации (анализ 64 образцов), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

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

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	5x10 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 стандартных образцов предприятия (СОП) № 49 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями G88C, S91P, D94G в гене *gyrA* и D461N, E501D в гене *gyrB*» (СОП № 49 ПКО ДНК МБТ mut-1 FQ), СОП № 50 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями A90V, D94N в гене *gyrA* и D461N в гене *gyrB*» (СОП № 50 ПКО ДНК МБТ mut-2 FQ), СОП № 51 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями G88A, D94N в гене *gyrA* и D461N в гене *gyrB*» (СОП № 51 ПКО ДНК МБТ mut-3 FQ), СОП № 52 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями D94Y в гене *gyrA* и D461N в гене *gyrB*» (СОП № 52 ПКО ДНК МБТ mut-4 FQ), СОП № 53 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК МБТ с мутациями D94A в гене *gyrA* и D461N в гене *gyrB*» (СОП № 53 ПКО ДНК МБТ mut-5 FQ) и СОП № 3 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК штамма *M. tuberculosis* H37Ra дикого типа (без мутаций)» (СОП № 3 ПКО ДНК МБТ H37Ra-wt) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл. Набор реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-II» не выявляет мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ к фторхинолонам, при тестировании СОП № 3 ПКО ДНК МБТ H37Ra-wt, не содержащих мутации ни в одном из анализируемых генов, и специфично выявляет мутации в ДНК МБТ, связанные с лекарственной устойчивостью МБТ к фторхинолонам, при тестировании СОП № 49 ПКО ДНК МБТ mut-1 FQ, СОП № 50 ПКО ДНК МБТ mut-2 FQ, СОП № 51 ПКО ДНК МБТ mut-3 FQ, СОП № 52 ПКО ДНК МБТ mut-4 FQ и СОП № 53 ПКО ДНК МБТ mut-5 FQ.

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, *Staphylococ-*

cus 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).

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-II» подразумевает использование не нативных образцов биологического материала или культур МБТ, а уже выделенной из них тотальной ДНК, которая содержит ДНК МБТ в определенной концентрации.

Для пробоподготовки образцов перед тестированием с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-II» 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 гибридно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» производства **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, объём, условия/срок хранения и транспортирования которых не соответствуют требованиям, указанным в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования (с учётом повторяемости) была определена для набора реагентов в двух лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах.

Испытания показали 100 % воспроизводимость и повторяемость результатов исследования.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики (чувствительность и специфичность) набора реагентов с доверительной вероятностью 95 % были определены на основании сопоставления 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, полученных с помощью испытуемого набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-II» и набора сравнения – набора реагентов «MTB-RESIST-II-тест» (ООО «ТестГен», Россия, РУ № РЗН 2022/19258).

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), амплификатор детектирующий «ДТпрайм» (РУ № ФСР 2011/10229), амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (РУ № ФСР 2019/8446).

Результаты клинических испытаний набора реагентов представлены в табл. 3, диагностические показатели набора – в табл. 4.

Таблица 3 — Результаты оценки диагностических показателей набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-II» относительно набора сравнения

Вид исследуемого материала (общее количество образцов)	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=236)	Обнаружены мутации (положительные)	112	0
	Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	124
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулёза (N=102)	Обнаружены мутации (положительные)	48	0
	Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	54

Таблица 4 — Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-II»

Вид исследуемого материала (общее количество образцов)	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), мочи) (N=236)	100 % (96,76-100 %)	100 % (97,07-100 %)
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулёза (N=102)	100 % (92,60-100 %)	100 % (93,40-100 %)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического

² Диагностическая чувствительность относительно использованного набора сравнения

³ Диагностическая специфичность относительно использованного набора сравнения

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 %.

- Проводить исследования в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции, или боксах микробиологической безопасности II класса.

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

- Во время работы с образцами на этапах их взятия, предварительной обработки и экстракции ДНК использовать противочумные костюмы IV типа (или аналоги), респираторы 3-го класса защиты FFP3, одноразовые шапочки, очки и одноразовые перчатки.

- 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, упаковку⁴, 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. Одноразовые пластиковые расходные материалы (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

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

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

Предварительная подготовка исследуемого материала и экстракция ДНК

1. Набор 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) (для экстракции ДНК и отбора проб с концентрацией ДНК МБТ не менее 5×10^2 ГЭ/мл).
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к набору реагентов «АмплиТест[®] МБТ».

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-50 F:
 - а) закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 0,6 мл 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 – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 или до 200 мкл, до 1000 мкл.
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Микроцентрифуга-вортекс.

6. Механические дозаторы переменного объёма с возможностью дозирования от 0,5 до 10 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл.
7. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий не менее 4 независимых каналов флуоресцентной детекции (FAM, HEX, ROX, Cy5), зарегистрированный в РФ и удовлетворяющий следующим требованиям:
 - для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
 - точность поддержания температуры не более $\pm 0,4$ °С;
 - скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
 - скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.
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. Ёмкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-II» 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 закручивающиеся ёмкости из полипропилена объёмом 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 её 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 завинчивающихся или плотно закрывающихся полипропиленовых пробирках объёмом 1,5 мл.

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! Объём пробы ДНК МБТ (после экстракции), предназначенной для исследования, должен быть не менее 50 мкл при использовании набора формы 1 и не менее 110 мкл – при использовании формы 2.

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»

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

Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F (форма 1)

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, которое требуется для приготовления реакционной смеси. Необходимо приготовить четыре разные реакционные смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-FL МБТ-ФХ № 1 или ПЦР-смеси-FL МБТ-ФХ № 2, или ПЦР-смеси-FL МБТ-ФХ № 3, или ПЦР-смеси-FL МБТ-ФХ № 4 и 5 мкл ПЦР-буфера-Н. Каждую реакционную смесь следует готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 9) плюс запас на одну реакцию.

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

ВНИМАНИЕ! ПЦР-буфер-Н необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционных смесей и убирать в морозильную камеру сразу же после добавления в реакционные смеси.

2. Разморозить пробирки с ПЦР-смесями-FL. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли кратким центрифугированием.
3. В четырёх отдельных пробирках подготовить четыре реакционные смеси. Внести необходимое количество ПЦР-смеси-FL МБТ-ФХ № 1 или МБТ-ФХ № 2, или МБТ-ФХ № 3, или МБТ-ФХ № 4 и ПЦР-буфера-Н, перемешать и осадить капли кратким центрифугированием.
4. Отобрать необходимое (четырёхкратное) количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб, рекомендуется расставить в четыре ряда.
5. В каждый ряд пробирок внести по 15 мкл одной из четырёх приготовленных реакционных смесей. При использовании ПО FRT Manager важно, чтобы смеси для каждого образца шли по порядку: № 1, № 2, № 3, № 4 – можно по вертикали или горизонтали.
6. Неиспользованные остатки реакционных смесей утилизировать.
7. 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 объёмом 50 мкл по 5 мкл ВКО-М (можно изменять объём пробы, но ВКО-М необходимо добавлять в 10 раз меньше по объёму, чем пробу), перемешать и осадить капли кратким центрифугированием (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 вносить!

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.

8. В четыре 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 **50 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.

9. Поставить контрольные реакции (по одному повтору каждой):
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+ ФХ-А)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К+ МБТ-ФХ-А**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+ ФХ-В)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К+ МБТ-ФХ-В**;
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К–**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха, и/или кратковременно центрифугировать.

Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-64 L (форма 2)

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

1. Отобрать необходимое количество цефленовых пакетов с

четырьмя различными готовыми лиофилизированными реакционными смесями: **Смесью-FL МБТ-ФХ № 1-Lyo**, **Смесью-FL МБТ-ФХ № 2-Lyo**, **Смесью-FL МБТ-ФХ № 3-Lyo**, **Смесью-FL МБТ-ФХ № 4-Lyo**, для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 5). Каждый цефленовый пакет содержит по одному стрипу из 8 пробирок с одноименной смесью. Для анализа одного образца требуется по одной пробирке из четырех стрипов с разными смесями.

2. Подготовить пробы ДНК к амплификации: однократно внести в каждую пробу ДНК объемом **110 мкл** по **11 мкл ВКО-М**, перемешать и осадить капли кратким центрифугированием (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 вносить!

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-II» 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.

3. Вскрыть цефленовые пакеты, извлечь стрипы с различными лиофилизированными реакционными смесями и расставить в штативе по порядку: сначала смесь № 1, затем № 2, № 3 и № 4.

ВНИМАНИЕ! Цефленовые пакеты необходимо вскрывать непосредственно перед использованием указанных реагентов. Не хранить лиофилизированные смеси после вскрытия цефленовых пакетов!

4. В четыре 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 2.

ВНИМАНИЕ! Объем экстрагированной пробы ДНК МБТ, предназначенной для исследования, должен быть не менее **110 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+ ФХ-А)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями внести по **23 мкл L+ МБТ-ФХ-А**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (L+ ФХ-В)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями внести по **23 мкл L+ МБТ-ФХ-В**;
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями внести по **23 мкл К–**.

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

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. 5).

Таблица 5 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁵ и планшетного⁶ типа

Цикл	Температура, °C	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 (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange), Cy5 (Red)	
	72	15 с		

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора строго по порядку для каждого образца (включая контроли), начиная с реакционной смеси № 1. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки прибора планшетного типа (тестирования небольшого количества образцов) рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки/стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала с помощью ПО «FRT Manager» или ПО амплификатора.
- 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 четырём различным каналам флуоресцентной детекции и четырём реакционным

⁵ Rotor-Gene Q (QIAGEN).

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

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 этапа амплификации ДНК в соответствии с табл. 6 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 6 — Контроль достоверности этапа амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Номер ПЦР-смеси-FL МБТ-ФХ/Смеси- FL МБТ-ФХ	Контроль	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)			
		FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
№ 1/№1-Lyo	К–	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
№ 2/№2-Lyo		отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
№ 3/№3-Lyo		отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
№ 4/№4-Lyo		отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
№ 1/№1-Lyo	К+ ФХ-A/ L+ ФХ-A	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного
№ 2/№2-Lyo		<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	отсутствует
№ 3/№3-Lyo		отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> не более граничного	отсутствует
№ 4/№4-Lyo		<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	отсутствует
№ 1/№1-Lyo	К+ ФХ-B/ L+ ФХ-B	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> не более граничного	отсутствует
№ 2/№2-Lyo		отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного
№ 3/№3-Lyo		<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного
№ 4/№4-Lyo		отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного

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

Принципы интерпретации результатов следующие:

1. **Не обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинолонам**, если для данной пробы во всех четырёх ПЦР-смесьях/Смесьях-FL: отсутствуют значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), Cy5 (Red), и определено значение *Ct* не более граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange; детекция ВКО).

2. **Обнаружена(ы) мутация(и), связанная(ые) с устойчивостью МБТ к фторхинолонам**, если для данной пробы определено значение *Ct* не более граничного по какому-либо одному или нескольким каналам FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), Cy5 (Red) в любой из четырёх ПЦР-смесей/Смесей-FL. При этом во всех смесьях должно быть определено значение *Ct* не более граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange; детекция ВКО).

Результат выдается в виде конкретной(ых) мутации(й), связанной(ых) с устойчивостью МБТ к фторхинолонам, которую(ые) определяют в соответствии с табл. 1.

3. **Результат сомнительный**, если для данной пробы определено значение *Ct* больше граничного по какому-либо одному или нескольким каналам FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), Cy5 (Red) в любой из четырёх ПЦР-смесей/Смесей-FL. При этом во всех смесьях должно быть определено значение *Ct* не более граничного по каналу для флуорофора ROX (Orange; детекция ВКО).

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

4. **Результат невалидный**, если для данной пробы значение *Ct* превышает граничное по каналу для флуорофора ROX (Orange; детекция ВКО) в одной или нескольких пробирках, и отсутствуют значения *Ct* одновременно по трём каналам в этой же ПЦР-смеси-FL/Смеси-FL или более каналам в других ПЦР-смесьях-FL/Смесьях-FL из перечисленных далее: FAM (Green), JOE (HEX, VIC, Yellow), Cy5 (Red).

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

5. **Ошибка**, если для исследуемого образца отсутствуют значения порогового цикла (C_t) одновременно по всем четырём каналам в одной или нескольких пробирках со Смесьями-FL.

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.

Наглядные примеры интерпретации результатов приведены в Приложении 1.

Возможные ошибки:

1. Для положительных контролей ПЦР (К+ ФХ-А/ L+ ФХ-А, К+ ФХ-В/ L+ ФХ-В) 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 положительных контролей ПЦР (К+ ФХ-А/ L+ ФХ-А, К+ ФХ-В/ L+ ФХ-В) значение порогового цикла (C_t) определено там, 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. 9 месяцев. Набор реагентов с истёкшим 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. Набор реагентов при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Часть 1 комплекта «ПЦР-комплект» вариант **FRT-50 F** в составе реагентов ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 1, ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 2, ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 3, ПЦР-смесь-FL МБТ-ФХ № 4, ПЦР-буфер-Н хранить в морозильной камере от минус 24 до минус 16 °С.

ПЦР-смеси-FL МБТ-ФХ № 1, № 2, № 3 и № 4 хранить в защищенном от света месте!

Часть 2 комплекта «ПЦР-комплект» вариант **FRT-50 F** в составе реагентов ВКО-М, К+ МБТ-ФХ-А, К+ МБТ-ФХ-В, К- хранить в холодильной камере при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

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

Не хранить лиофилизированные Смесь-FL МБТ-ФХ № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 2-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 3-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 4-Lyo после вскрытия цефленовых пакетов!

Смесь-FL МБТ-ФХ № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 2-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 3-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 4-Lyo беречь от воздействия солнечного света.

Не использовать лиофилизированные Смесь-FL МБТ-ФХ № 1-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 2-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 3-Lyo, Смесь-FL МБТ-ФХ № 4-Lyo из поврежденных цефленовых пакетов!

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

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@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 использовать при
повреждении упа-
ковки и обратиться
к инструкции по
применению

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

Номер ПЦР-смеси- FL/Смеси-FL МБТ-ФХ	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинлонам:
	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yel- low)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Не обнаружены
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	+ ≤ граничного	-	+ ≤ граничного	-	Обнаружена мутация S91P в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	+ ≤ граничного	+ ≤ граничного	-	Обнаружена мутация A90V в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	+ ≤ граничного	Обнаружена мутация G88C в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Обнаружена мутация D94H в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	+ ≤ граничного	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Обнаружена мутация D94G в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	+ ≤ граничного		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Обнаружена мутация D94N
№ 2/№2-Lyo	-	-		+ ≤ граничного	

Номер ПЦР-смеси- FL/Смеси-FL МБТ-ФХ	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинлонам:
	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yel- low)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	в гене <i>gusA</i>
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Обнаружена мутация D94A в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	+ ≤ граничного	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Обнаружена мутация D94Y в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	+ ≤ граничного		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Обнаружена мутация G88A в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Обнаружена мутация E501D в гене <i>gusB</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	+ ≤ граничного	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Обнаружена мутация D461N в гене <i>gusB</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 4/№4-Lyo	-	+ ≤ граничного		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Обнаружена мутация D461N в гене <i>gusB</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		+ ≤ граничного	
№ 1/№1-Lyo	-	+ ≤ граничного		-	Обнаружены мутации A90V и D94G в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	+ ≤ граничного	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	

Номер ПЦР-смеси- FL/Смеси-FL МБТ-ФХ	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинлонам:
	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yel- low)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	+ ≤ граничного		-	
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	+ ≤ граничного	Обнаружены мутации A90V и D94N в гене <i>gusA</i>
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	+ ≤ граничного	-		-	
№ 2/№2-Lyo	-	+ ≤ граничного	+ ≤ граничного	-	Обнаружены мутации S91P и D94G в гене <i>gusA</i>
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	+ ≤ граничного	-	+ ≤ граничного	-	Обнаружены мутации S91P и D94A в гене <i>gusA</i>
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	+ ≤ граничного	-	+ ≤ граничного	-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	+ > граничного	-	+ ≤ граничного	-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Сомнительный
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	+ > граничного	
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Сомнительный
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	+ > граничного	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	

Номер ПЦР-смеси- FL/Смеси-FL МБТ-ФХ	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинлонам:
	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yel- low)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)	
№ 1/№1-Lyo	-			-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	+ > граничного	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	+ > граничного	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	+ > граничного	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		+ > граничного	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	+ > граничного	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ ≤ граничного	-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	+ > граничного	+ ≤ граничного	-	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	Сомнительный

Номер ПЦР-смеси- FL/Смеси-FL МБТ-ФХ	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинлонам:
	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yel- low)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)	
№ 2/№2-Lyo	-	-		-	
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		+ > граничного	
№ 1/№1-Lyo	-	-		-	
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ > граничного	-	Невалидный
№ 3/№3-Lyo	-	-		-	
№ 4/№4-Lyo	-	-		-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	+ > граничного	-	
№ 2/№2-Lyo					
№ 3/№3-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	Невалидный
№ 4/№4-Lyo					
№ 1/№1-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 2/№2-Lyo	-	-	+ > граничного	-	Невалидный
№ 3/№3-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 4/№4-Lyo					
№ 1/№1-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	Невалидный
№ 2/№2-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 3/№3-Lyo	-	-	+ > граничного	-	
№ 4/№4-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 1/№1-Lyo					
№ 2/№2-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	Невалидный
№ 3/№3-Lyo					
№ 4/№4-Lyo	-	-	+ > граничного	-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	-	-	
№ 2/№2-Lyo	-	-	-	-	Ошибка
№ 3/№3-Lyo	-	-	-	-	
№ 4/№4-Lyo	-	-	-	-	
№ 1/№1-Lyo	-	-	-	-	Ошибка
№ 2/№2-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	

Номер ПЦР-смеси- FL/Смеси-FL МБТ-ФХ	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Общий результат анализа: мутации, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинлонам:
	FAM (Green)	JOE (HEX, VIC, Yel- low)	ROX (Orange)	Sy5 (Red)	
№ 3/№3-Lyo					
№ 4/№4-Lyo					
№ 1/№1-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	Ошибка
№ 2/№2-Lyo	–	–	–	–	
№ 3/№3-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 4/№4-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 1/№1-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	Ошибка
№ 2/№2-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 3/№3-Lyo	–	–	–	–	
№ 4/№4-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 1/№1-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	Ошибка
№ 2/№2-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	
№ 3/№3-Lyo	–	–	–	–	
№ 4/№4-Lyo	Не учитывается	Не учитывается	+ ≤ граничного	Не учитывается	

Примечание:

запись «+ ≤ граничного» в таблице означает, что значение Ct определено не более граничного (меньше или равно граничному), которое указано во вкладыше к набору,

запись «+ > граничного» в таблице означает, что значение Ct определено больше граничного,

знак «–» означает, что значение Ct отсутствует.