



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«19» октября 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для качественного выявления генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулезного комплекса к аминогликозидам и фторхинолонам, методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени «MTB-RESIST-II-тест» по ТУ 21.20.23-044-97638376-2021

Содержание

Список сокращений	2
Введение.....	4
1. Назначение.....	5
2. Принцип метода	6
3. Состав набора реагентов	9
4. Характеристики набора реагентов.....	14
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.	27
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	28
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	31
8. Анализируемые образцы	32
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	40
10. Проведение анализа	41
11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	57
12. Утилизация	59
13. Гарантийные обязательства, контакты	60
Приложение А	61

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КВМ	контроль взятия материала

Введение

Целевой анализ: полиморфизмы генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB* микобактерий туберкулезного комплекса:

ген *rrs*: 1401A>G, 1402C>T и 1484G>T;

ген *eis*: C-14G, C-14T, C-12T, G-10C, G-10A и G-37T;

ген *gyrA*: p.G88C, p.A90V, p.S91P, p.D94G, p.D94N, p.D94H, p.D94A и p.D94Y;

ген *gyrB*: p.D461H, p.D461N, p.N499D, p.E501V и p.A504V.

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности выявляемой последовательности ДНК) в отношении молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB* микобактерий туберкулезного комплекса.

Применение молекулярно-генетических методов для выявления полиморфизмов в генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, рекомендовано в Клинических рекомендациях «Туберкулез у взрослых» Министерства здравоохранения Российской Федерации (год утверждения: 2020) и Клинических рекомендациях «Туберкулез у детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (год утверждения: 2020). Перечень полиморфизмов и их связь с развитием лекарственной устойчивости подробно рассмотрены в Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance – Supplementary document. World Health Organization. WHO/UCN/GTB/PCI/2021.7 – © WHO 2021.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания к применению: набор реагентов «МТВ-RESIST-II -тест» рекомендуется применять для пациентов с подтвержденным диагнозом легочный и внелегочный туберкулез для выбора соответствующей терапии.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических

аспектов применения набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» предназначен для качественного выявления молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулезного комплекса к химиотерапевтическим препаратам второй линии – аминогликозидам (гены *rrs* и *eis*) и фторхинолонам (гены *gyrA* и *gyrB*) с помощью технологии молекулярных маяков с детекцией температур плавления в режиме реального времени в пробе ДНК, выделенной из клинического материала (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, промывные воды желудка, плевральная жидкость, кровь, моча, культуры микроорганизмов, секрет простаты, тканевой (биопсийный и операционный) материал, синовиальная жидкость, перикардальная жидкость и спинномозговая жидкость), у пациентов с подтвержденным диагнозом легочный и внелегочный туберкулез для выбора соответствующей терапии.

Функциональное назначение – качественное выявление молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулезного комплекса к химиотерапевтическим препаратам второй линии – аминогликозидам (гены *rrs* и *eis*) и фторхинолонам (гены *gyrA* и *gyrB*), у пациентов с подтвержденным диагнозом легочный и внелегочный туберкулез для выбора соответствующей терапии.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического профиля. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная полимеразная цепная реакция в реальном времени с детекцией температур плавления ДНК-зондов (молекулярные маяки).

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются образцы ДНК, выделенные из мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, промывных вод желудка, плевральной жидкости, крови, мочи, культур микроорганизмов, секрета простаты, тканевого (биопсийного и операционного) материала, синовиальной жидкости, перикардальной жидкости и спинномозговой жидкости.

Принцип определения

Качественное выявление молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к аминогликозидам (гены *rrs* и *eis*) и фторхинолонам (гены *gyrA* и *gyrB*), микобактерий туберкулезного комплекса методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени с детекцией температур плавления дуплексов ДНК-зондов (молекулярные маяки) и целевых фрагментов ДНК в пробе ДНК, выделенной из клинического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК с дальнейшим плавлением ДНК-зондов;
3. Интерпретация результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков геномной ДНК при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера 5x входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют флуоресцентно-меченые ДНК-зонды (молекулярные маяки), которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени. ДНК-зонды с 5` и 3`-концов снабжены адаптерами (адаптер с 5`-конца комплементарен адаптеру

с 3'-конца), а также с одного конца – красителем, с другого – тушителем. При формировании адаптерами гибридизационного комплекса, происходит сближение красителя и тушителя и, соответственно, наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции. Формирование гибридизационного комплекса ДНК-зонда и ДНК-мишени приводит к пространственному разобщению красителя и тушителя и, соответственно, к увеличению интенсивности флуоресценции. Температура плавления ДНК-зондов зависит от количества комплементарных нуклеотидов ДНК-зонда и ДНК-мишени. Наивысшее значение температуры плавления T_m регистрируется при наиболее полном соответствии ДНК-зондов ДНК-мишени. Анализ температур плавления гибридизационных комплексов ДНК-зонда и ДНК-мишени позволяет сделать вывод о количестве комплементарных нуклеотидов ДНК-зонда и ДНК-мишени и о соответствии определенного ДНК-зонда ДНК-мишени, в результате чего делается заключение о нахождении молекулярно-генетических полиморфизмов. Таким образом, при интерпретации результатов учитываются температуры плавления (T_m) молекулярных маяков в образце по сравнению с ПКО-1, соответствующий «дикому» типу – референсному штамму *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank: NC_000962.3).

Набор содержит реагенты для качественного выявления молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к аминогликозидам (гены *rrs* и *eis*) и фторхинолонам (гены *gyrA* и *gyrB*), а также ВКО (табл. 1).

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения ДНК и наличие возможных ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к получению ложноотрицательных результатов.

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Смесь олигонуклеотидов	Канал, соответствующий флуорофору				
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5
A	ген <i>rrs</i> : не 1401A>G и 1402C>T	ген <i>rrs</i> : 1401A>G	ген <i>rrs</i> : 1402C>T	ген <i>rrs</i> : 1401A>G + 1402C>T	ВКО
B	ген <i>rrs</i> : не 1484G>T	ген <i>rrs</i> : 1484G>T	–	–	–
C	ген <i>eis</i> : не C-14G, C-14T, C-12T, G-10C и G-10A	ген <i>eis</i> : C-14G	ген <i>eis</i> : C-14T	ген <i>eis</i> : C-12T	–
D	ген <i>eis</i> : не G-37T	ген <i>eis</i> : G-37T	ген <i>eis</i> : G-10C	ген <i>eis</i> : G-10A	–
E	ген <i>gyrA</i> : не p.G88C, A90V, S91P, D94G, D94N, D94H, D94A и D94Y	ген <i>gyrA</i> : p.G88C	ген <i>gyrA</i> : p.A90V	ген <i>gyrA</i> : p.S91P	–
F	ген <i>gyrA</i> : p.D94G	ген <i>gyrA</i> : p.D94N	ген <i>gyrA</i> : p.D94H	ген <i>gyrA</i> : p.D94A	–
G	ген <i>gyrB</i> : не p.D461H и D461N	ген <i>gyrB</i> : p.D461H	ген <i>gyrB</i> : p.D461N	ген <i>gyrA</i> : p.D94Y	–
H	ген <i>gyrB</i> : не p.N499D, E501V и A504V	ген <i>gyrB</i> : p.N499D	ген <i>gyrB</i> : p.E501V	ген <i>gyrB</i> : p.A504V	–

Общее время проведения анализа составляет от 2 часов до 2 часов 45 минут (без учета пробоподготовки).

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК или

проведения реакции ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

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

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

3. Состав набора реагентов

Форма комплектации

Набор реагентов выпускается в 2-х вариантах исполнения:

1. Вариант исполнения «MTB-RESIST-II-тест-х12» – рассчитан на исследование 12 образцов - 9 исследуемых образцов, отрицательного и двух положительных контрольных образцов (1 запуск амплификатора при единовременной загрузке 96 лунок);

2. Вариант исполнения «MTB-RESIST-II-тест-х96» – рассчитан на исследование 96 образцов - 72 исследуемых образцов, при поочередном запуске амплификатора на 96 лунок с использованием каждого мультиплекса с отрицательным и двумя положительными контрольными образцами в каждой постановке (8 запусков амплификатора при единовременной загрузке 96 лунок).

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав набора реагентов варианта исполнения «MTB-RESIST-II-тест-х12»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
3	Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
4	Смесь олигонуклеотидов С	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
5	Смесь олигонуклеотидов D	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
6	Смесь олигонуклеотидов E	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
7	Смесь олигонуклеотидов F	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
8	Смесь олигонуклеотидов G	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
9	Смесь олигонуклеотидов H	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 180 мкл
10	ПКО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 120 мкл
11	ПКО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 120 мкл
12	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 300 мкл

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
13	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 100 мкл

Таблица 3 – Состав набора реагентов варианта исполнения «МТВ-RESIST-II-тест-х96»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1920 мкл
2	Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
3	Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
4	Смесь олигонуклеотидов С	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
5	Смесь олигонуклеотидов D	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
6	Смесь олигонуклеотидов E	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
7	Смесь олигонуклеотидов F	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
8	Смесь олигонуклеотидов G	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
9	Смесь олигонуклеотидов H	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	1 пробирка, 1440 мкл
10	ПКО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 960 мкл

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
11	ПКО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 960 мкл
12	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1200 мкл
13	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 800 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

ПЦР-буфер 5x готов к использованию и представляет собой 5X смесь, содержащую все основные реагенты, включая рекомбинантную полимеразу (модифицированная Taq ДНК-полимераза), моноклональные мышинные антитела к Taq-полимеразе, ионы магния, Tris-HCl, одновалентные катионы, неионные детергенты, стабилизаторы.

Смеси олигонуклеотидов А–Н готовы к использованию и содержат праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней. Смесь олигонуклеотидов находится в 10% водном растворе ТЕ (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

ПКО-1 (положительный контрольный образец-1) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – фрагментов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, не содержащие выявляемые полиморфизмы и соответствующие референсному штамму *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank: NC_000962.3) и целевые последовательности внутреннего контрольного образца в

концентрации 1×10^7 копий/мл каждый. ПКО-1 находится в 10% ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

ПКО-2 (положительный контрольный образец-2) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – фрагментов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, содержащие полиморфизмы (относительно референсного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – GenBank: NC_000962.3) в генах:

rrs: 1401A>G, 1402C>T и 1484G>T;

eis: C-14G, C-14T, C-12T, G-10C, G-10A, G-37T;

gyrA: p.G88C, p.A90V, p.S91P, p.D94G, p.D94N, p.D94H, p.D94A и p.D94Y;

gyrB: p.N499D, p.E501V, p.A504V, p.D461H и p.D461N.

и целевые последовательности внутреннего контрольного образца в концентрации 1×10^7 копий/мл каждый. ПКО-2 находится в 10% ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

ОКО (отрицательный контрольный образец) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз.

ВКО (внутренний контрольный образец) готов к использованию и представляет собой плазмидную ДНК с концентрацией $1,5 \times 10^6$ копий/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 4 – Набор реагентов «MTB-RESIST-II-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
1.1. Внешний вид		
1.1.1. Вариант исполнения «MTB-RESIST-II-тест-x12»		
ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов С	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов D	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов E	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов F	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов G	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов H	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.1.2. Вариант исполнения «MTB-RESIST-II-тест-x96»		
ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов С	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов D	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
	сиреневый оттенок	пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов E	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов F	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов G	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов H	Прозрачная жидкость, возможен сиреневый оттенок	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-044-97638376-2021	Раздел 7, пункт 7.9
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-044-97638376-2021	Раздел 7, пункт 7.9
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-044-97638376-2021	Раздел 7, пункт 7.9
2. Функциональные характеристики		
2.1. Положительный результат с ПКО-1	<p>Регистрируются единичные пики для каждой реакционной смеси в диапазоне:</p> <p>Реакционная смесь А: канал FAM 72±4°C, канал HEX 71±4°C, канал ROX 72±4°C, канал Су5 65±4°C, канал Су5.5 65±5°C</p> <p>Реакционная смесь В: канал FAM 69±4°C, канал HEX 65±4°C, канал ROX не учитывается, канал Су5 не учитывается, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь С: канал FAM 68±4°C, канал HEX 62±4°C, канал ROX 69±4°C, канал Су5 64±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь D: канал FAM 69±4°C, канал HEX 68±4°C,</p>	Раздел 7, пункт 7.7.2

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
	<p>канал ROX $53\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5 $59\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь Е: канал FAM $73\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $69\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX $66\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5 $60\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь F: канал FAM $75\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $70\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX $71\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5 $67\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь G: канал FAM $72\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $69\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX $68\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5 $73\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь H: канал FAM $70\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $69\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX $68\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5 $70\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5.5 не учитывается</p>	
2.2. Положительный результат с ПКО-2	<p>Регистрируются единичные пики для каждой реакционной смеси в диапазоне:</p> <p>Реакционная смесь А: канал FAM $67\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $75\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX $67\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5 $71\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5.5 $65\pm 5^{\circ}\text{C}$</p> <p>Реакционная смесь В: канал FAM $62\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $71\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX не учитывается, канал Су5 не учитывается, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь С: канал FAM $53\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $71\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX $65\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5 $53\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь D: канал FAM $69\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал HEX $67\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал ROX $44\pm 4^{\circ}\text{C}$, канал Су5</p>	Раздел 7, пункт 7.7.2

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
	<p>49±4°С, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь Е: канал FAM 70±4°С, канал HEX 65±4°С, канал ROX 63±4°С, канал Су5 54±4°С, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь F: канал FAM 73±4°С, канал HEX 70±4°С, канал ROX 75±4°С, канал Су5 65±4°С, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь G: канал FAM 65±4°С, канал HEX 75±4°С, канал ROX 66±4°С, канал Су5 73±4°С, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь H: канал FAM 67±4°С, канал HEX 73±4°С, канал ROX 66±4°С, канал Су5 69±4°С, канал Су5.5 не учитывается</p>	
2.3. Отрицательный результат с ОКО	Единичные пики для каждой реакционной смеси в диапазоне: по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Су5/Red, а также Су5.5/Crimson отсутствуют.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.4 Прохождение реакции в пробирках с КОС	Единичные пики для каждой реакционной смеси в диапазоне: по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Су5/Red, а также Су5.5/Crimson отсутствуют.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.5 Прохождение реакции в пробирках с КОС-1	<p>Регистрируются единичные пики для каждой реакционной смеси в диапазоне:</p> <p>Реакционная смесь А: канал FAM 72±4°С, канал HEX 71±4°С, канал ROX 72±4°С, канал Су5 65±4°С, канал Су5.5 65±5°С</p> <p>Реакционная смесь В: канал FAM 69±4°С, канал HEX 65±4°С,</p>	Раздел 7, пункт 7.7.2

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
	<p>канал ROX не учитывается, канал Су5 не учитывается, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь С: канал FAM 68±4°C, канал HEX 62±4°C, канал ROX 69±4°C, канал Су5 64±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь D: канал FAM 69±4°C, канал HEX 68±4°C, канал ROX 53±4°C, канал Су5 59±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь E: канал FAM 73±4°C, канал HEX 69±4°C, канал ROX 66±4°C, канал Су5 60±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь F: канал FAM 75±4°C, канал HEX 70±4°C, канал ROX 71±4°C, канал Су5 67±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь G: канал FAM 72±4°C, канал HEX 69±4°C, канал ROX 68±4°C, канал Су5 73±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p>Реакционная смесь H: канал FAM 70±4°C, канал HEX 69±4°C, канал ROX 68±4°C, канал Су5 70±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p>	
2.6 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ-2	<p>Регистрируются единичные пики для каждой реакционной смеси в диапазоне:</p> <p>Реакционная смесь А: канал FAM 67±4°C, канал HEX 75±4°C, канал ROX 67±4°C, канал Су5 71±4°C, канал Су5.5 65±5°C</p> <p>Реакционная смесь В: канал FAM 62±4°C, канал HEX 71±4°C, канал ROX не учитывается, канал</p>	Раздел 7, пункт 7.7.2

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
	<p>Су5 не учитывается, канал Су5.5 не учитывается</p> <p><u>Реакционная смесь С:</u> канал FAM 53±4°C, канал HEX 71±4°C, канал ROX 65±4°C, канал Су5 53±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p><u>Реакционная смесь D:</u> канал FAM 69±4°C, канал HEX 67±4°C, канал ROX 44±4°C, канал Су5 49±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p><u>Реакционная смесь E:</u> канал FAM 70±4°C, канал HEX 65±4°C, канал ROX 63±4°C, канал Су5 54±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p><u>Реакционная смесь F:</u> канал FAM 73±4°C, канал HEX 70±4°C, канал ROX 75±4°C, канал Су5 65±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p><u>Реакционная смесь G:</u> канал FAM 65±4°C, канал HEX 75±4°C, канал ROX 66±4°C, канал Су5 73±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p> <p><u>Реакционная смесь H:</u> канал FAM 67±4°C, канал HEX 73±4°C, канал ROX 66±4°C, канал Су5 69±4°C, канал Су5.5 не учитывается</p>	

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 14 инструкции).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Набор реагентов «MTB-RESIST-II-тест» специфичен по отношению к целевым фрагментам генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB* ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, включая *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК:

нетуберкулезных микобактерий (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. terrae*), и гетерологичных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1 и 2 типов (в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл)

4.2.2. Аналитическая чувствительность: предел обнаружения

Не менее 2 000 копий геномной ДНК на 1 мл биоматериала, при условии выделения ДНК из 100 мкл образца и элюции объемом 50 мкл.

4.2.3. Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости стандартные образцы предприятия были исследованы по 10 повторам:

- **СОП-ПКО-1**, представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов геномной ДНК микобактерий (фрагментов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, не содержащие выявляемые полиморфизмы и соответствующие нуклеотидной последовательности референсному штамму *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank: NC_000962.3) и целевые последовательности внутреннего контрольного образца в концентрации 1×10^7 копий/мл каждый в 10% ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА), производства ООО «ТестГен». **Содержит 100% нормальных копий ДНК («дикий тип» генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB* (без мутаций));**

- **СОП-ПКО-2**, представляющий собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – фрагментов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, содержащие полиморфизмы (относительно референсного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – GenBank: NC_000962.3) в генах:

rrs: 1401A>G, 1402C>T и 1484G>T;

eis: C-14G, C-14T, C-12T, G-10C, G-10A, G-37T;

gyrA: p.G88C, p.A90V, p.S91P, p.D94G, p.D94N, p.D94H, p.D94A и p.D94Y;

gyrB: p.N499D, p.E501V, p.A504V, p.D461H и p.D461N.

и целевые последовательности внутреннего контрольного образца в концентрации 1×10^7 копий/мл каждый в 10% ТЕ-буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА), производства ООО «ТестГен».

Содержит 100% мутантных копий ДНК.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%.

4.2.4. Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчету прецизионности в условиях повторяемости, однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости коэффициент вариации не превышал 5%.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний был использован **204** клинических образца (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, промывные воды желудка, плевральная жидкость, кровь, моча, культуры микроорганизмов, секрет простаты, тканевой (биопсийный и операционный) материал, синовиальная жидкость, перикардиальная жидкость и спинномозговая жидкость), от пациентов с подтвержденным диагнозом легочный и внелегочный туберкулез.

Для оценки перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» были исследованы также **12** образцов нетуберкулезных микобактерий (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. terrae*) и **37** образцов, не содержащих исследуемые аналиты, но с подтвержденным положительным наличием гетерологичных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, Human herpesvirus 5, Human herpesvirus 1, Human herpesvirus 2.

Такое количество образцов было набрано в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом рекомендаций Международного руководства CLSI EP09-A3.

При исследовании Вариантов исполнения «МТВ-RESIST-II-тест-х12» и «МТВ-RESIST-II-тест-х96» выделения ДНК из клинических образцов проводили с помощью:

– для выделения ДНК из мокроты, крови, мочи и секрета простаты: Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

– для выделения ДНК из бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, промывных вод желудка, плевральной

жидкости, культуры микроорганизмов, тканевого (биопсийного и операционного) материала, синовиальной жидкости, перикардиальной жидкости и спинномозговой жидкости - Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» по ТУ 9398-004-01897593-2008 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.).

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест», производства ООО «ТестГен» и набором сравнения Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, лекарственно устойчивых/чувствительных к фторхинолонам, амикацину/канамицину, каприомицину методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Полипроб ЛУ ТБ-2» по ТУ 9398-003-26124018-2015, ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», Россия (РУ № РЗН 2018/7891 от 25.06.2021).

Для проведения ПЦР-исследования были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

При тестировании всех 204 образцов испытуемым набором реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» в двух сериях (408 наблюдения) для всех трех амплификаторов результаты качественного определения статуса полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB* совпали с результатами набора сравнения «Полипроб ЛУ ТБ-2», ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС».

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик будут рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper C., Pearson E. The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*. 1934. Vol. 26(4). P. 404–413. doi:10.2307/2331986). Диагностические характеристики

испытуемого набора были рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Результаты изучения диагностических характеристик исследуемого медицинского изделия по отношению к каждому исследованному клиническому материалу и анализируемым молекулярно-генетическим полиморфизмам генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB* приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристики клинической эффективности

Вид исследуемого материала	Исследуемый ген	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мокрота	<i>rrs</i>	14	50	(100% (95% ДИ:76,84%-100%))	(100% (95% ДИ:92,89%-100%))
	<i>eis</i>	24	40	100% (95% ДИ:85,75%-100%))	(100% (95% ДИ:91,19%-100%))
	<i>gyrA</i>	18	46	(100% (95% ДИ:81,47%-100%))	(100% (95% ДИ:81,47%-100%))
	<i>gyrB</i>	14	52	(100% (95% ДИ:76,84%-100%))	(100% (95% ДИ:93,15%-100%))
Бронхоальвеолярный лаваж	<i>rrs</i>	10	26	100% (95% ДИ:69,15%-100%))	(100% (95% ДИ:86,77%-100%))
	<i>eis</i>	14	26	(100% (95% ДИ:76,84%-100%))	(100% (95% ДИ:86,77%-100%))
	<i>gyrA</i>	8	20	(100% (95% ДИ:63,06%-100%))	(100% (95% ДИ:83,16%-100%))
	<i>gyrB</i>	6	28	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%))	(100% (95% ДИ:87,66 %-100%))
Промывные воды бронхов	<i>rrs</i>	16	34	100% (95% ДИ:79,41%-100%))	100% (95% ДИ:89,72%-100%))
	<i>eis</i>	12	36	100% (95% ДИ:73,54%-100%))	(100% (95% ДИ:90,26%-100%))
	<i>gyrA</i>	18	32	(100% (95% ДИ:81,47%-100%))	(100% (95% ДИ:89,11%-100%))
	<i>gyrB</i>	8	42	(100% (95% ДИ:63,06%-100%))	(100% (95% ДИ:91,59%-100%))
Промывные	<i>rrs</i>	14	22	(100%)	(100%)

е воды желудка				(95% ДИ:76,84%-100%)	(95% ДИ:84,56%-100%)
	<i>eis</i>	8	26	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)	(100% (95% ДИ:86,77%-100%)
	<i>gyrA</i>	8	26	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)	(100% (95% ДИ:86,77%-100%)
	<i>gyrB</i>	6	28	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)	(100% (95% ДИ:87,66 %-100%)
Плевральная жидкость	<i>rrs</i>	10	18	100% (95% ДИ:69,15%-100%)	100% (95% ДИ:81,47%-100%)
	<i>eis</i>	4	24	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	(100% (95% ДИ:85,75%-100%)
	<i>gyrA</i>	10	18	(100% (95% ДИ:69,15%-100%)	(100% (95% ДИ:81,47%-100%)
	<i>gyrB</i>	8	20	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)	(100% (95% ДИ:83,16%-100%)
Кровь	<i>rrs</i>	20	40	(100% (95% ДИ:83,16%-100%)	(100% (95% ДИ:91,19%-100%)
	<i>eis</i>	12	44	(100% (95% ДИ:73,54%-100%)	(100% (95% ДИ:91,96%-100%)
	<i>gyrA</i>	22	34	(100% (95% ДИ:84,56%-100%)	(100% (95% ДИ:89,72%-100%)
	<i>gyrB</i>	8	48	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)	(100% (95% ДИ:92,60%-100%)
Моча	<i>rrs</i>	14	34	(100% (95% ДИ:76,84%-100%)	(100% (95% ДИ:89,72%-100%)
	<i>eis</i>	12	32	(100% (95% ДИ:73,54%-100%)	(100% (95% ДИ:73,54%-100%)
	<i>gyrA</i>	10	32	(100% (95% ДИ:69,15%-100%)	(100% (95% ДИ:89,11%-100%)
	<i>gyrB</i>	14	30	(100% (95% ДИ:76,84%-100%)	(100% (95% ДИ:88,43%-100%)
Культуры микроорганизмов	<i>rrs</i>	4	8	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)
	<i>eis</i>	4	8	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)
	<i>gyrA</i>	6	8	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)

				100%)	100%)
	<i>gyrB</i>	2	10	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	100% (95% ДИ:69,15%-100%)
Секрет простаты	<i>rrs</i>	6	12	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)	100% (95% ДИ:73,54%-100%)
	<i>eis</i>	2	16	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	100% (95% ДИ:79,41%-100%)
	<i>gyrA</i>	8	10	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)	100% (95% ДИ:69,15%-100%)
	<i>gyrB</i>	4	14	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:76,84%-100%)
Тканевой (биопсийный и операционный) материал	<i>rrs</i>	8	20	(100% (95% ДИ:63,06%-100%)	100% (95% ДИ:83,16%-100%)
	<i>eis</i>	12	16	100% (95% ДИ:73,54%-100%)	100% (95% ДИ:79,41%-100%)
	<i>gyrA</i>	12	16	100% (95% ДИ:73,54%-100%)	100% (95% ДИ:79,41%-100%)
	<i>gyrB</i>	4	24	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:85,75%-100%)
Синовиальная жидкость	<i>rrs</i>	2	12	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	100% (95% ДИ:73,54%-100%)
	<i>eis</i>	4	10	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:69,15%-100%)
	<i>gyrA</i>	4	10	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:69,15%-100%)
	<i>gyrB</i>	4	10	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:69,15%-100%)
Перикардиальная жидкость	<i>rrs</i>	2	6	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:54,07 %-100%)
	<i>eis</i>	2	8	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	100% (95% ДИ:63,06%-100%)
	<i>gyrA</i>	4	6	(100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:54,07 %-100%)
	<i>gyrB</i>	2	8	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	100% (95% ДИ:63,06%-100%)
Спинно-мозговая жидкость	<i>rrs</i>	6	8	(100% (95% ДИ:54,07 %-100%)	100% (95% ДИ:63,06%-100%)

	<i>eis</i>	4	8	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%))	(100% (95% ДИ:63,06%- 100%))
	<i>gyrA</i>	4	10	(100% (95% ДИ:39,76%- 100%))	100% (95% ДИ:69,15%- 100%))
	<i>gyrB</i>	2	12	(100% (95% ДИ:15,81%- 100%))	100% (95% ДИ:73,54%- 100%))

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;

2. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;

3. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО-1, ПКО-2 или продуктами ПЦР;

4. Проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);

5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;

6. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набора реагентов для качественного выявления генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к аминогликозидам и фторхинолонам микобактерий туберкулезного комплекса методом мультиплексной ПЦР-РВ «MTB-RESIST-II-тест» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б, в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н (в редакции приказа Минздрава России от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий»).

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «МТВ-RESIST-II-тест», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «МТВ-RESIST-II-тест», не токсичны, поскольку готовятся путем смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09), приказом от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических 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». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09, требований приказа от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855).

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

– удалять неиспользованные реактивы в соответствии с 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.

– применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

– допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III–IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

– не использовать набор по истечении срока годности;

– избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Оборудование:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема;
4. Холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
5. Морозильная камера от -2 °С до -40 °С.
6. Амплификатор¹ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM, HEX, ROX, Cy5 и Cy5.5: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Версия программного обеспечения для детектирующих амплификаторов производства ООО «НПО ДНК-Технология» не ниже 7.7.5.23, рекомендуемая версия 7.7.5.44².

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Ахуген», США).
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (при использовании амплификаторов планшетного типа) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2

¹ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

² По мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

мл³, или пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой (например, Axugen, США), совместимые с используемым амплификатором.

4. Халат и одноразовые перчатки без талька.

5. Емкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

7. Набор для выделения ДНК из клинического материала (см. п. 8.2 Инструкции).

8. При проведении анализа с использованием мокроты и синовиальной жидкости: Реагент для предобработки слизистого материала «МУКОЛИЗИН» по ТУ 9398-159-01897593-2011, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (РУ № ФСР 2011/12082 от 13.03.2019).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются образцы ДНК, выделенные из мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, промывных вод желудка, плевральной жидкости, крови, мочи, культур микроорганизмов, секрета простаты, тканевого (биопсийного и операционного) материала, синовиальной жидкости, перикардальной жидкости и спинномозговой жидкости.

8.1. Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012, с приказом от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855.

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и

³ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым амплификатором.

правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами III группы патогенности.

Забор материала на исследование

Забор материала необходимо производить до начала химиотерапии.

Мокрота. Следует собирать в одноразовые завинчивающиеся емкости с широким горлом объемом не менее 50 мл. Рекомендуемый объем биоматериала – от 3 до 5 мл. В целях повышения информативности практикуется повторное (до трех раз в течение трех последовательных дней) исследование мокроты.

Промывные воды бронхов, желудка, бронхоальвеолярный лаваж, спинномозговая жидкость. Собирать в одноразовые плотно завинчивающиеся емкости объемом не менее 5 мл.

Кровь, плевральная жидкость, перикардиальная жидкость. Рекомендуется собирать в вакуумные пробирки с консервантом ЭДТА. После забора биоматериала рекомендуется несколько раз перевернуть пробирку для перемешивания консерванта.

Моча (средняя часть утренней порции или вся утренняя порция). Следует собирать в стерильные контейнеры, одноразовые завинчивающиеся емкости с широким горлом объемом не менее 50 мл, после тщательного туалета наружных половых органов. Анализ мочи на микобактерии должен предусматривать обязательное трехкратное исследование.

Секрет простаты. Взятие материала осуществляют в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 секрет простаты забирают после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной железы ее собирают в одноразовую стерильную сухую пластиковую пробирку объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и маркируют.

В случае, если количество клинического материала не достигает объема, необходимого для проведения экстракции ДНК (100 мкл), требуется довести объем с помощью физиологического раствора. При невозможности получить секрет, сразу после массажа простаты, собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл.

Синовиальная жидкость. Собирать в одноразовые плотно завинчивающиеся емкости.

Тканевой (биопсийный и операционный) материал. Следует помещать в одноразовые вакуумные пробирки с консервантом ЭДТА или одноразовые завинчивающиеся пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 0,2 мл стерильного физиологического раствора.

Культуры микроорганизмов. Ресуспендировать колонию в 0,2 мл стерильного физиологического раствора – в случае плотной питательной среды, или использовать непосредственно жидкую среду.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала

– мокрота, тканевой (биопсийный и операционный) материал, культуры микроорганизмов: при температуре от +2 до +8 °С – не более 3 суток, при температуре от -18 до -22 °С – не более 1 недели.

– бронхоальвеолярный лаваж и промывные воды бронхов, секрет простаты, моча, синовиальная, плевральная, перикардальная, спинномозговая жидкости, промывные воды желудка: при температуре от +2 до +8 °С – не более 1 суток, при температуре от -18 до -22 °С – не более 1 недели.

– кровь: при температуре от +2 до +8 °С – не более 12 часов.

Кровь не замораживать. Допускается двукратное замораживание и оттаивание остального клинического материала.

8.2. Предварительная обработка материала

Объем аликвоты для экстракции ДНК – не менее 100 мкл в случае жидкого биоматериала или 10–20 мм³ гомогената твердой ткани. Аликвота должна быть помещена в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Все пробирки с исследуемыми образцами должны быть промаркированы. Рекомендованный объем элюции – 50 мкл.

Мокрота и синовиальная жидкость. Требуется предварительная обработка муколизином (РУ №ФСР 2011/12082 от 13.03.2019) в соответствии с инструкцией к используемому набору для выделения нуклеиновых кислот.

Промывные воды бронхов, желудка, перикардальная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж, спинномозговая жидкость. Перемешать переворачиванием, после чего отобрать 1 мл образца в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Пробирку промаркировать. Центрифугировать 10 минут при 10 000 g. Используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой, удалить супернатант, оставив необходимый для экстракции объем образца.

Кровь, плевральная жидкость. Подготовка не требуется.

Моча (средняя часть утренней порции или вся утренняя порция). Взболтать контейнер с мочой, перенести 10 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой, центрифугировать 5 минут при 10 000 g или 20 минут при 3 000 g. Используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой, удалить супернатант. К осадку добавить транспортную среду до конечного объема 0,2–1,0 мл (в зависимости от необходимого для экстракции объема). В случае отсутствия видимого осадка после центрифугирования, не следует полностью удалять супернатант, необходимо оставить около 0,2–1,0 мл. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе.

Секрет простаты. В случае, если количество клинического материала не достигает объема, необходимого для проведения экстракции ДНК (100 мкл), требуется довести объем с помощью физиологического раствора. При невозможности получить секрет, сразу после массажа простаты, собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве

15–25 мл. В этом случае предварительную обработку проводить по предыдущему пункту.

Тканевый (биопсийный и операционный) материал. Требуется предварительная гомогенизация образца объемом 10–20 мм³ любым доступным способом. Далее встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3–5 секунд.

Культуры микроорганизмов. В случае использования микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде, использовать 5–10 мкл суспензии, доведенной стерильным физиологическим раствором до объема, необходимого для экстракции ДНК. В случае использования микроорганизмов, выросших на жидкой питательной среде, аликвоту объемом 500–1000 мкл центрифугировать 5 минут при 3 000 g, после чего удалить супернатант и довести объем стерильным физиологическим раствором до объема, необходимого для экстракции ДНК.

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие микобактериальных инфекций, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности, приказом от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (в редакции Приказа Минздравсоцразвития РФ от 29.10.2009 № 855.

Утилизация клинического материала (класс В), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

8.3. Процедура получения пробы ДНК человека, выделенной из клинического материала

Для выделения пробы ДНК человека из клинического материала рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

– при использовании в качестве клинического материала мокроты, крови, мочи и секрета простаты: Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по

ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

– при использовании в качестве клинического материала бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, промывных вод желудка, плевральной жидкости, культуры микроорганизмов, тканевого (биопсийного и операционного) материала, синовиальной жидкости, перикардиальной жидкости и спинномозговой жидкости: Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» по ТУ 9398-004-01897593-2008 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.).

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

К каждому исследуемому образцу перед выделением следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения ДНК в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО. Если инструкцией производителя набора реагентов для выделения ДНК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК:

- при температуре от +2 до +8°C – не более суток (24 ч),
- при температуре от -18 до -22°C – не более месяца,
- при -80°C – длительно.

ВНИМАНИЕ! Перед анализом необходимо убедиться в наличии в образце ДНК микобактерий туберкулезного комплекса с помощью соответствующего набора реагентов.

8.4. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» было проверено в

отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца биологическим агентом (гемоглобин, гиалуриновая кислота) может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест», приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Интерферирующие вещества

Тип	Вещество	Активный компонент	Максимальная концентрация
Эндогенные	Биологические агенты	гемоглобин	260 мкг/мл
		гиалуриновая кислота	50 мкг/мл
Экзогенные	Противотуберкулезный препарат	изониазид	0,02 мг/мл
	Антибиотик, рифампицин	рифампицин	0,02 мг/мл
	Антибиотик, аминогликозид.	стрептомицин	0,2 мг/мл
	Антибиотик, аминогликозид.	канамицин	0,2 мг/мл
	Антибиотик, аминогликозид.	амикацин	0,2 мг/мл
	Противотуберкулезный препарат	этамбутол	0,02 мг/мл
	Противотуберкулезный препарат	пиразинамид	0,05 мг/мл
	Антибактериальный препарат группы фторхинолонов	офлоксацин	0,04 мг/мл
	Антибактериальный препарат группы	ципрофлоксацин	0,05 мг/мл

	фторхинолонов		
	Противотуберкулезный препарат	протионамид	0,05 мг/мл
	Антибиотик группы производных аминосалициловой кислоты. Противотуберкулезный препарат.	капреомицин	0,2 мг/мл
	Антибиотик. Противотуберкулезный препарат	цикloserин	0,05 мг/мл

В ходе проведения испытаний была проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ на результат анализа, полученный с помощью исследуемого набора реагентов. По результатам исследования экзогенные вещества (лекарственные средства, применяемые при лечении пациентов с диагнозом легочный и внелегочный туберкулез) и эндогенные вещества (вещества, встречающиеся в конкретных видах биологических образцов – кровь, гиалуроновая кислота) не оказывают интерферирующего воздействия на работу набора.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);
- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении требований к процедуре предварительной обработки;
- не допускается использование образцов, загрязненных посторонним биологическим материалом;
- не допускается использование образцов, несоответствующих предъявляемым требованиям.

В случае присутствия в анализируемом образце ДНК нескольких штаммов микобактерий туберкулезного комплекса, несущих разные полиморфизмы анализируемых регионов генов, возможно получение невалидных результатов.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать согласно таблице 7 в ПЦР-пробирках перед проведением анализа.

Подготовка компонентов набора для исследования

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером 5x, смесями олигонуклеотидов А–Н, ПКО-1, ПКО-2 и ОКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объемом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из расчета: 8 x (количество исследуемых образцов + 1 ПКО-1 + 1 ПКО-2 + 1 ОКО) (табл. 7).

Перед приготовлением реакций необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нем, с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

Таблица 7 – Принцип маркировки пробирок

	Исследуемые образцы			ПКО-1	ПКО-2	ОКО
	1	2	n			
Реакционная смесь А	○	○	○	○	○	○
Реакционная смесь В	○	○	○	○	○	○
Реакционная смесь С	○	○	○	○	○	○
Реакционная смесь D	○	○	○	○	○	○
Реакционная смесь E	○	○	○	○	○	○
Реакционная смесь F	○	○	○	○	○	○
Реакционная смесь G	○	○	○	○	○	○
Реакционная смесь H	○	○	○	○	○	○

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР
2. ПЦР-амплификация ДНК с анализом температур плавления ДНК-зондов в режиме реального времени
3. Интерпретация результатов в контрольных образцах
4. Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции.

Для приготовления каждой реакционной смеси – А, В, С, D, E, F, G и H необходимо:

- ПЦР-буфер 5x – 5 мкл,

- Соответствующая смесь олигонуклеотидов – 15 мкл,
- Образец (исследуемый образец ДНК, ПКО-1, ПКО-2 или ОКО) – 5 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл или планшет для ПЦР.

2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь А: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов А, где n – количество исследуемых образцов.

3. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь В: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов В, где n – количество исследуемых образцов.

4. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь С: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов С, где n – количество исследуемых образцов.

5. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь D: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов D, где n – количество исследуемых образцов.

6. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь E: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов E, где n – количество исследуемых образцов.

7. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь F: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов F, где n – количество исследуемых образцов.

8. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь G: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов G, где n – количество исследуемых образцов.

9. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную

смесь Н: $(n+4) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5x и $(n+4) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов Н, где n – количество исследуемых образцов.

10. В соответствующие пробирки для ПЦР внести по 20 мкл приготовленной реакционной смеси А–Н (табл. 7).

11. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл выделенной ДНК (табл. 7). В пробирки для ПКО-1, ПКО-2 и ОКО препарат ДНК не вносится.

12. Внести в соответствующие 8 пробирок по 5 мкл ПКО-1.

13. Внести в соответствующие 8 пробирок по 5 мкл ПКО-2.

14. Внести в соответствующие 8 пробирок по 5 мкл ОКО, прошедшего этап выделения.

15. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) ПЦР-амплификация ДНК с анализом температур плавления ДНК-зондов в режиме реального времени

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ПЦР, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Тип анализа: ПЦР-амплификация с дальнейшим анализом кривых плавления с детекцией сигнала флуоресценции. Протокол ПЦР указан в таблицах 8–9, в зависимости от используемого амплификатора.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов QuantStudio 5 и аналогичных необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации. Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «Melt Curve Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x3 – m3, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

3. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM, HEX, ROX, Cy5 и Cy5.5 для реакционной смеси А и FAM, HEX, ROX и Cy5 для реакционных смесей В–Н.

5. Запустить протокол амплификации с анализом кривых плавления.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 8 – Протокол ПЦР и анализ температур плавления для амплификаторов CFX96 (BioRad, США) QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00	–	–
2	95	00:15	–	50
	64	00:45	–	
3	Плавление с 35°С до 85°С, инкремент 0,5°С	00:10	FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5	100

Таблица 9 – Протокол ПЦР и анализ температур плавления для амплификатора «ДТпрайм» (производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00	–	–
2	95	00:15	–	50
	64	00:45	–	
3	Плавление с 35°С до 85°С, инкремент 1,0°С	00:25	FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5	50

В) Регистрация и интерпретация результатов

Интерпретация результатов выполняется по значениям температур плавления (T_m), соответствующие максимальному уровню флуоресценции по каналам детекции, соответствующим флуорофорам FAM, HEX, ROX, Cy5 и Cy5.5 для реакционной смеси А и FAM, HEX, ROX и Cy5 для реакционных смесей В–Н.

Для всех исследуемых образцов по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5, а также Cy5.5 для реакционной смеси А должны регистрироваться единичные пики плавления с температурой плавления (T_m) в диапазоне от 40 до 80 °С. Допустимо наличие дополнительных пиков с меньшей интенсивностью флуоресцентного сигнала по сравнению с целевым пиком.

Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО-1, ПКО-2 и ОКО.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора «ДТпрайм» следует выбрать функцию «-dF/dT». Автоматическая детекция пиков для всех каналов детекции может быть технически недоступна, в случае этого необходимо использовать «Температурный маркер» и ручное определение температур плавления (T_m).

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора CFX96 пороговую линию следует устанавливать таким образом, чтобы в температурном диапазоне от 40 до 80 °С производилась детекция одного пика (допустимо наличие дополнительных пиков с меньшей интенсивностью флуоресцентного сигнала).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ПКО-1 и ПКО-2 должны детектироваться четкие одиночные пики плавления (допустимо наличие дополнительных пиков с меньшей интенсивностью флуоресцентного сигнала) с диапазонами температур, отраженными в таблице 10. Конкретные температуры плавления могут варьировать и зависят от используемой модели амплификатора.

При невозможности дифференциации пиков плавления программным обеспечением амплификатора, но при четкой их визуальной дифференциации, допускается определение температур плавления ручным способом.

Для ОКО пики плавления по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 должны отсутствовать (табл. 10).

Таблица 10 – Результаты для ПКО-1, ПКО-2 и ОКО

Контрольный образец	Значения T_m по каналам детекции, соответствующим флуорофорам, °C				
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5
реакционная смесь А					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	72±4	71±4	64±5	65±4	65±5
ПКО-2	67±4	75±4	59±5	71±4	65±5
реакционная смесь В					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	69±4	65±4	–	–	–
ПКО-2	62±4	71±4	–	–	–
реакционная смесь С					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	68±4	62±4	69±4	64±4	–
ПКО-2	53±4	71±4	65±4	53±4	–
реакционная смесь D					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	69±4	68±4	53±4	59±4	–
ПКО-2	69±4	67±4	44±4	49±4	–
реакционная смесь E					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	73±4	69±4	66±4	60±4	–
ПКО-2	70±4	65±4	63±4	54±4	–
реакционная смесь F					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	75±4	70±4	71±4	67±4	–
ПКО-2	73±4	70±4	75±4	65±4	–
реакционная смесь G					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	72±4	69±4	68±4	73±4	–
ПКО-2	65±4	75±4	66±4	73±4	–
реакционная смесь H					
ОКО	пики плавления отсутствуют				–
ПКО-1	70±4	69±4	68±4	70±4	–
ПКО-2	67±4	73±4	66±4	69±4	–

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 10, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО-1 или ПКО-2 значений, отличающихся от указанных в таблице 10, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО-1 или ПКО-2 значений, отличающихся от указанных в таблице 10, необходимо заменить реагенты.

Г) Интерпретация результатов

Для всех исследуемых образцов по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5 для всех реакционных смесей, а также Cy5.5 для реакционной смеси А должны регистрироваться единичные пики плавления с соответствующими температурными характеристиками (T_m) в диапазоне от 40 до 80 °С. При невозможности выявления пиков температур плавления (T_m) программным обеспечением амплификатора, но при четкой их визуальной дифференциации, допускается определение температур плавления ручным способом.

При интерпретации допускается отсутствие пиков плавления у образцов по некоторым из каналов, что может быть связано с наличием определенных полиморфизмов и концентрацией матрицы. При отсутствии более 70% пиков плавления результат для всех реакций с исследуемым образцом считается невалидным (возможна низкая концентрация ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в образце, наличие ингибиторов или наличие в образце других близкородственных к микобактериям туберкулезного комплекса видов – *M. avium*, *M. abscessus* и др.).

По каналу Cy5.5 реакционной смеси А производится детекция внутреннего контрольного образца. По этому каналу должен регистрироваться пик с температурой плавления от 60 до 70 °С. Положительное прохождение ВКО свидетельствует об эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии в реакции ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции с ВКО и одновременном отсутствии реакций по каналам спецификации FAM,

HEX, ROX и Cy5 всех реакционных смесей, результат следует считать невалидным, для данного исследуемого образца провести повторное исследование, начиная с выделения ДНК. При отсутствии реакции с ВКО, но наличии реакций по каналам спецификации FAM, HEX, ROX и Cy5, результаты следует считать достоверными. В случае повторения невалидного результата следует заново произвести забор биоматериала у данного пациента.

Температуры плавления образцов анализируются в сравнении с ПКО-1 данной реакционной смеси по каждому каналу по формуле:

$$\Delta T_m = T_m(\text{ПКО-1}) - T_m(\text{образец}).$$

Так, например, для реакционной смеси А производится вычисление:

$$\Delta T_{m(\text{FAM})} = T_{m(\text{ПКО-1 FAM})} - T_{m(\text{образец FAM})};$$

$$\Delta T_{m(\text{HEX})} = T_{m(\text{ПКО-1 HEX})} - T_{m(\text{образец HEX})};$$

$$\Delta T_{m(\text{ROX})} = T_{m(\text{ПКО-1 ROX})} - T_{m(\text{образец ROX})};$$

$\Delta T_{m(\text{Cy5})} = T_{m(\text{ПКО-1 Cy5})} - T_{m(\text{образец Cy5})}$ (и далее по аналогии для всех реакционных смесей).

Интерпретация проводится в соответствии с таблицами 11–17, где анализируются полученные значения ΔT_m .

На основании выявленных полиморфизмов делается вывод о резистентности микобактерий туберкулезного комплекса к действию химиотерапевтических препаратов.

Таблица 11 – Принцип интерпретации результатов для гена *rrs* реакционной смеси А

	Реакционная смесь				Результат
	А				
	FAM	HEX	ROX	Cy5	
	норма	1401A>G	1402C>T	1401A>G + 1402C>T	
ΔT_m					
1.	≥ -2	≥ -2 ; по одному из каналов пик плавления может отсутствовать		полиморфизмы 1401A>G и 1402C>T гена <i>rrs</i> не обнаружены	
2.	н/у	< -2 по одному из каналов; по одному из каналов пик плавления может отсутствовать		выявлен полиморфизм гена <i>rrs</i> , соответствующий каналу с наименьшим значением ΔT_m исключение составляет случай при $\Delta T_m(\text{HEX}) < 0$ и $\Delta T_m(\text{Cy5}) < 0$: указывается только полиморфизм 1401A>G	
3.	< -2	≥ -2 по всем каналам; по одному из каналов пик плавления может отсутствовать		невалидный результат для гена <i>rrs</i> реакционной смеси А	
4.	н/у	пик плавления отсутствует по двум и более каналам		невалидный результат для гена <i>rrs</i> реакционной смеси А	

Обозначения: «н/у» – значения ΔT_m при интерпретации не учитываются.

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для гена *rrs* реакционной смеси В

	Реакционная смесь				Результат
	В				
	FAM	HEX	ROX	Cy5	
	норма	1484G>T	–	–	
ΔT_m					
1.	≥ -2	≥ -2 или отс.	н/у	н/у	полиморфизм 1484G>T гена <i>rrs</i> не обнаружен
2.	≥ -2 или отс.	< -2			обнаружен полиморфизм 1484G>T гена <i>rrs</i>
3.	< -2	< -2			невалидный результат для гена <i>rrs</i> реакционной смеси В
4.	отс.				невалидный результат для гена <i>rrs</i> реакционной смеси В

Обозначения: «н/у» – значения T_m при интерпретации не учитываются.

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для гена *eis* реакционных смесей С и D

	Реакционная смесь						Результат
	С			D			
	FAM	HEX	ROX	Cy5	ROX	Cy5	
	норма	C-14G	C-14T	C-12T	G-10C	G-10A	
ΔT_m							
1.	≥ -2	≥ -2 , по двум из каналов пик плавления может отсутствовать					полиморфизмы C-14G, C-14T, C-12T, G-10C и G-10A гена <i>eis</i> не обнаружены
2.	≥ -2	< -2 по одному из каналов; по двум из каналов пик плавления может отсутствовать					выявлен полиморфизм гена <i>eis</i> , соответствующий каналу с наименьшим значением ΔT_m
3.	< -2	≥ -2 для всех каналов; по двум из каналов пик плавления может отсутствовать					невалидный результат для гена <i>eis</i>
4.	н/у	пик плавления отсутствует по трем и более каналам					невалидный результат для гена <i>eis</i>

Обозначения: «н/у» – значения ΔT_m при интерпретации не учитываются.

Таблица 14 – Принцип интерпретации результатов для гена *eis* реакционной смеси D

	Реакционная смесь		Результат
	D		
	FAM	HEX	
	норма	G-37T	
	ΔT_m		
1.	≥ -2	≥ -2 или отс.	полиморфизм G-37T гена <i>eis</i> не обнаружен
2.	≥ -2 или отс.	< -2	обнаружен полиморфизм G-37T гена <i>eis</i>
3.	< -2	< -2	невалидный результат для гена <i>eis</i> реакционной смеси D
4.	отс.		невалидный результат для гена <i>eis</i> реакционной смеси D

Обозначения: «н/у» – значения T_m при интерпретации не учитываются.

Таблица 15 – Принцип интерпретации результатов для гена *gyrA* реакционных смесей E, F и G

		Реакционная смесь								Результат	
		E				F					G
		FAM	HEX	ROX	Cy5	FAM	HEX	ROX	Cy5		Cy5
норма	p.G88C	p.A90V	p.S91P	p.D94G	p.D94N	p.D94H	p.D94A	p.D94Y	ΔT_m		
1.	≥ -2	≥ -2 , по трем из каналов пик плавления может отсутствовать								полиморфизмы p.G88C, p.A90V, p.S91P, p.D94G, p.D94N, p.D94H, p.D94A и p.D94Y гена <i>gyrA</i> не обнаружены	
2.	н/у	< -2 по одному из каналов; по трем из каналов пик плавления может отсутствовать								выявлен полиморфизм гена <i>gyrA</i> , соответствующий каналу с наименьшим значением ΔT_m	
3.	< -2	≥ -2 для всех каналов; по трем из каналов пик плавления может отсутствовать								невалидный результат для гена <i>gyrA</i>	
4.	н/у	пик плавления отсутствует по четырем и более каналам								невалидный результат для гена <i>gyrA</i>	

Обозначения: «н/у» – значения ΔT_m при интерпретации не учитываются.

Таблица 16 – Принцип интерпретации результатов для гена *gyrB* реакционной смеси G

		Реакционная смесь			Результат
		G			
FAM	HEX	ROX			
норма	p.D461H	p.D461N			
ΔT_m					
1.	≥ -2	≥ -2 ; по одному из каналов пик плавления может отсутствовать		полиморфизмы p.D461H и p.D461N гена <i>gyrB</i> не обнаружены	
2.	n/y	< -2 по одному из каналов; по одному из каналов пик плавления может отсутствовать		выявлен полиморфизм гена <i>gyrB</i> , соответствующий каналу с наименьшим значением ΔT_m	
3.	< -2	≥ -2 по обоим каналам		невалидный результат для гена <i>gyrB</i>	
4.	пик плавления отсутствует по двум и более каналам			невалидный результат для гена <i>gyrB</i>	

Обозначения: «n/y» – значения ΔT_m при интерпретации не учитываются.

Таблица 17 – Принцип интерпретации результатов для гена *gyrB* реакционной смеси Н

		Реакционная смесь				Результат
		Н				
		FAM	HEX	ROX	Cy5	
		норма	p.N499D	p.E501V	p.A504V	
		ΔT_m				
1.	≥ -2	≥ -2 ; по одному из каналов пик плавления может отсутствовать				полиморфизмы p.N499D, p.E501V и p.A504V гена <i>gyrB</i> не обнаружены
2.	≥ -2	< -2 по одному из каналов; по одному из каналов пик плавления может отсутствовать				выявлен полиморфизм гена <i>gyrB</i> , соответствующий каналу с наименьшим значением ΔT_m
3.	< -2	≥ -2 по всем каналам				невалидный результат для гена <i>gyrB</i>
4.	пик плавления отсутствует по двум и более каналам					невалидный результат для гена <i>gyrB</i>

Обозначения: «н/у» – значения ΔT_m при интерпретации не учитываются.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР; наличие в образце нескольких штаммов микобактерий туберкулезного комплекса, несущих разные мутации анализируемых регионов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, и др.

В случае невалидного результата заключение не выдается, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ. При повторении невалидного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

Таблица 18 – Ассоциация полиморфизмов генов *rrs* и *eis* с резистентностью к аминогликозидам

Полиморфизм	Резистентность к аминогликозидам:			
	канамицин	амикацин	капреомицин	стрептомицин
ген <i>rrs</i>				
1401A>G (a1401g)	++	++	++	?
1402C>T (c1402t)	+	+	++	?
1484G>T (g1484t)	++	++	++	?
ген <i>eis</i>				
C-14G	– ^А	– ^А	–	–
C-14T	++	++	–	–
C-12T	++	–	–	–
G-10C	?	?	–	–
G-10A	++	?	–	–
G-37T	++	?	–	–

Обозначения: «++» – ассоциация полиморфизма с резистентностью к соответствующему препарату; «+» – ассоциация полиморфизма с умеренной резистентностью к соответствующему препарату; «?» – неопределенное значение полиморфизма в формировании резистентности; «–» – ассоциация полиморфизма с резистентностью отсутствует (по: Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance – Supplementary document. World Health Organization. WHO/UCN/GTB/PCI/2021.7 – © WHO 2021; «^А» – по: Pholwat S. et al. *eis* Promoter C14G and C15G Mutations Do Not Confer Kanamycin Resistance in Mycobacterium tuberculosis // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016. Vol. 60 (12). P. 7522–7523).

Таблица 19 – Ассоциация полиморфизмов генов *gyrA* и *gyrB* с резистентностью к фторхинолонам

Полиморфизм	Резистентность к фторхинолонам:	
	левофлоксацин	моксифлоксацин
ген <i>gyrA</i>		
p.G88C	++	++
p.A90V	++	++
p.S91P	++	++
p.D94G	++	++
p.D94N	++	++
p.D94H	++	++
p.D94A	++	++
p.D94Y	++	++
ген <i>gyrB</i>		
p.D461H	?	?
p.D461N	+	+
p.N499D	+	+
p.E501V	+	+
p.A504V	+	+

Обозначения: «++» – ассоциация полиморфизма с резистентностью к соответствующему препарату; «+» – ассоциация полиморфизма с умеренной резистентностью к соответствующему препарату; «?» – неопределенное значение полиморфизма в формировании резистентности; «-» – ассоциация полиморфизма с резистентностью отсутствует (по: Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance – Supplementary document. World Health Organization. WHO/UCN/GTB/PCI/2021.7 – © WHO 2021).

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный положительный или отрицательный результат качественного выявления молекулярно-генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулезного комплекса к химиотерапевтическим препаратам второй линии – аминогликозидам (гены *rrs* и *eis*) и фторхинолонам (гены *gyrA* и *gyrB*), может быть использован квалифицированным специалистом (врачом), с учетом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, для выбора соответствующей терапии для пациентов с подтвержденным диагнозом легочный и внелегочный туберкулез в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Туберкулез у взрослых» (возрастная категория: Взрослые; год утверждения: 2022), «Туберкулез у детей» (возрастная категория: Дети; год утверждения: 2022), Разработчики: Российское Общество Фтизиатров, Национальная ассоциация некоммерческих организаций фтизиатров «Ассоциация фтизиатров»» (утв. Минздравом России).

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 18 до минус 22 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от 2 до 8 °С до 5 суток. Допускается заморозка/оттаивание набора «МТВ-RESIST-II-тест» не более 5 раз.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Транспортировать при температуре от минус 18 до

минус 22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 22 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

12. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации 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».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 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» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме желтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Пробирки и упаковка набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» подлежат механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

13. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «МТВ-RESIST-II-тест» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Набор реагентов для качественного выявления генетических полиморфизмов генов *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к аминогликозидам и фторхинолонам микобактерий туберкулезного комплекса методом мультиплексной ПЦР-РВ «MTB-RESIST-II-тест» соответствует следующим межгосударственным стандартам на продукцию:

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям