

GenoType MTBDR*plus*

VER 2.0

Руководство к пользованию

IFU-304A-09

CE

IVD

только для диагностики in vitro

2019-04-25



GenoType MTBDRplus VER 2.0

Молекулярно-генетическое исследование для идентификации комплекса *M. tuberculosis* и определения его устойчивости к Рифампицину и Изониазиду в клинических образцах и культивированных образцах

Пожалуйста, перед тем как начать работу с набором, внимательно изучите всю инструкцию по применению. Чтобы получить правильные результаты тестирования, строго придерживайтесь установленной процедуры.

Предназначение

Тест GenoType MTBDRplus VER 2.0 - это качественный тест для диагностики *in vitro*, для идентификации комплекса *Mycobacterium tuberculosis* и определения его устойчивости к Рифампицину (RMP) и/или Изониазиду (INH) в положительных образцах мокроты или в отрицательных клинических и культивированных образцах. В туберкулёзный комплекс, входят следующие *M. tuberculosis*, вызывающие ТБ: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii* и *M. pinnipedii*. Выявление устойчивости к рифампицину возможно при детекции наиболее значимых ассоциированных мутаций гена *rpoB*, (кодирующего бета субъединицу РНК полимеразы). Для выявления устойчивости к изониазиду, исследуют ген *katG*, (кодирующий каталазу пероксидазу) и область промотора в гене *inhA* (кодирующего NADH эноил АСР редуктазу).

Данный тест показан для диагностических целей и предназначен для использования в медицинских лабораториях.

Резюме и пояснения

Туберкулёз (ТБ) – это инфекционное заболевание бактериальной природы, передающееся, как капельная инфекция. В 2017 году в мире было зарегистрировано 10,0 млн. случаев ТБ, и около 1,3 млн. случаев со смертельным исходом [1]. Лечение ТБ требует длительной терапии на протяжении нескольких месяцев. Появление и распространение MDR-ТБ (множественной лекарственной устойчивости) стало основной медицинской и общественной проблемой, угрожающей здравоохранению в мировом масштабе. MDR-ТБ можно определить, как ТБ, устойчивый по крайней мере к рифампицину и изониазиду – двум наиболее важным противотуберкулёзным препаратам первого ряда [2]. Множественная лекарственная устойчивость является большой проблемой в борьбе с туберкулёзом из-за сложности диагностики и лечения. В 2013 году во всём мире было выявлено около 480 000 случаев мульти-резистентного туберкулёза из 11 миллионов случаев ТБ [1].

Если диагноз MDR-ТБ не подтверждён, применение неадекватного и, следовательно, неэффективного лечения антибиотиками, может привести к дальнейшему распространению устойчивых форм бактерии и к нарастанию устойчивости. Поэтому ускоренная диагностика и идентификация мульти-резистентного туберкулёза необходимое условие для подбора соответствующего лечения.

Принцип тестирования

Тест GenoType MTBDRplus VER 2.0 основан на DNA•STRIP технологии. Процедура проведения теста подразделяется на три этапа: (i) выделение ДНК из клинических образцов (легочных, деконтаминированных) или культивированного материала (плотные/жидкие среды) - необходимые реагенты не поставляются, (ii) мультиплексная амплификация с биотинилированными праймерами, (iii) реверс-гибридизация.

Все реагенты, необходимые для амплификации, например, полимеразы или праймеры включены в Амплификационную Смесь А и В (АМ-А и АМ-В) и оптимизированы для данного теста. Мембраны стрипов покрыты специфическими зондами, комплементарными к амплифицированным нуклеиновым кислотам. После химической денатурации, одноцепочечные ампликоны связываются с зондами (гибридизация). Высоко специфичное связывание комплементарных цепей ДНК обусловлено жёсткими условиями, которые создаются в результате оптимального сочетания состава буфера и определённой температуры. Таким образом, зонды могут достоверно распознавать несколько вариантов последовательностей в тестируемой области гена. Конъюгированная стрептавидином щелочная фосфатаза связывается с биотином ампликонов посредством фрагментов стрептавидина. В итоге, щелочная фосфатаза превращает добавленный субстрат в окрашенную форму, которая становится видимой на мембране стрипов, как цветной преципитат. Простая и быстрая оценка полученных результатов проводится с помощью прилагаемого шаблона.

Реагенты и инструменты

Состав набора

Номер для заказа	304A	30496A
Количество тестов	12	96
Состав Комплекта 1 из 2 (хранить при температуре от 2°C до 8°C)		
Мембранные стрипы, покрытые специфическими пробами (MTBDRplus VER 2.0 STRIPS)	12	2x 48
Денатурирующий Раствор (DEN) содержит <2% NaOH, краситель	240 мкл	2x 960 мкл
Гибридизационный Буфер (HYB) содержит <10% анионное активное вещество, краситель	12 мл	96 мл
Раствор для Жесткой Промывки, (STR) содержит >25% четвертичных соединений аммиака, <1% анионных активных веществ, краситель	12 мл	96 мл
Раствор для Промывки, (RIN) содержит буфер, <1% NaCl, <1% неионогенное активное вещество,	36 мл	3x 96 мл
Концентрат Конъюгата (CON-C) содержит стрептавидин-конъюгированную щелочную фосфатазу, краситель	120 мкл	960 мкл
Буфер для Конъюгата (CON-D) содержит буфер, 1% блокирующего реагента, <1% NaCl	12 мл	96 мл
Субстратный Концентрат (SUB-C) содержит <70% диметилсульфоксида, <10% 4-нитро синего тетразолия хлорида, <10% 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата	120 мкл	960 мкл
Субстратный буфер (SUB-D) содержит буфер, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	12 мл	96 мл
Ванночка	1	4
Эталон для оценки	1	4
Руководство к пользованию	1	1
Шаблон	1	1
Этикетка партии	3	3

Состав Комплекта 2 из 2

 (хранить при температуре от -20°C до -18°C)

Амплификационная Смесь А (AM-A GT MTBDRplus VER 2.0) состоит из буфера, нуклеотидов, Tag полимеразы	120 мкл	4x 240 мкл
Амплификационная Смесь В (AM-B GT MTBDRplus VER 2.0) состоит из солей, специфических праймеров, красителя	420 мкл	4x 840 мкл

Хранение, обработка и утилизация компонентов набора

1/2 Состав Комплекта 1 из 2

2/2 Состав Комплекта 2 из 2

Хранить все Компоненты Комплекта 1 при температуре от 2°C до 8°C. Компоненты Комплекта 2 хранить при температуре от -20°C до -18°C и строго изолировано от контаминирующей ДНК. Не допускайте повторных циклов замораживания и оттаивания (>4x) AM-A и AM-B; при обработке небольшого количества образцов за одно тестирование, аликвотируйте AM-A и AM-B, используя подходящие пробирки с закручивающимися крышками (рекомендация: см. Главу Информация для заказа). После окончания срока годности, реактивы не использовать. Утилизация и уничтожение неиспользованных реагентов должны происходить в строгом соответствии с федеральными, государственными и местными законами.

Меры предосторожности при работе с компонентами набора

Необходимо соблюдать федеральные, государственные и местные законы безопасности труда и охраны окружающей среды. Всегда использовать защитную одежду и перчатки.

При работе с компонентами набора необходимо обращать внимание на следующие особые меры безопасности:

Буфер для Гибридизации (HYB) и Концентрат Субстрата (SUB-C) не классифицируются, как опасные вещества. Но, тем не менее, из-за некоторых ингредиентов, на них распространяется постановление об опасных веществах - EUN210: Паспорт безопасности доступен по запросу.



В Растворе для Денатурации (DEN) содержится <2% гидроксида натрия.

Осторожно!

H315: Вызывает раздражение кожи. H319: Вызывает серьезное раздражение глаз.

P280: Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/ средствами защиты глаз. P305+351+338: ПРИ ПОПАДАНИИ В Г

ЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это

легко сделать. Продолжить промывание глаз. P313: Обратиться к врачу.

Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Концентрат конъюгата (CON-C) и буфер для конъюгата (CON-D) содержат биологический материал. Соответственно, их следует рассматривать как потенциально опасные и обращаться с ними соответствующим образом (напр., см. [3] или [4]).

Необходимые, но не поставляемые материалы

- 0,5 мл пробирки с закручивающимися крышками или 1,5 мл пробирки с закручивающимися крышками для аликвот (Sarstedt, Nümbrecht, Германия, см. Информация для заказа)
- Фильтровальная бумага
- Микропипетки на 10, 20, 200 и 1000 мкл
- Одноразовые перчатки
- Одноразовые стерильные наконечники с фильтром
- Мерный цилиндр
- ПЦР-пробирки без ДНКаз и РНКаз
- Водяная баня с шейкером + Горизонтальная платформа *ulu TwinCubator* (аппарат для мануальной гибридизации) *ulu* аппарат для автоматизированной гибридизации
- Термоциклер
- Таймер
- Пинцет
- вода (дистиллированная)
- Вода (для молекулярно-биологических исследований, для отрицательного контроля)
- Наборы для выделения ДНК (**GenoLyse**® или **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, см. главу Информация для заказа) а также необходимое оборудование
- Реагенты для деконтаминации образца, а так же необходимое оборудование
- Реагенты для культивирования микобактерий и необходимое для амплификации оборудование (если используются культивированные образцы)

Контроль качества

Чтобы убедиться в корректном проведении тестов и для контроля функционирования всех компонентов набора, на каждом стрипе есть 5 контрольных зон:

- Зона Контроля Конъюгата (CC) для проверки связывания конъюгата со стрипом и правильного выполнения хромогенной реакции
- Зона Контроля Амплификации (AC), которая указывает на успешное проведение амплификации
- Три зоны Контроля Локусов (*rpoB*, *katG* и *inhA*), для проверки оптимальной чувствительности реакции для каждого тестируемого локуса

При проведении амплификации необходимо соблюдать обычные меры безопасности. Особенно важно, чтобы все реагенты и материалы, используемые для выделения ДНК и проведения амплификации, не содержали ДНК-аз.

Не комбинируйте и не пулируйте Амплификационные миксы или мембранные стрипы из разных наборов, если их лоты не совпадают. Номер партии набора и соответствующие номера партий компонентов набора находятся на этикетках партии, вложенных в комплект.

Проба отрицательного контроля для выявления возможной контаминации, содержащая воду вместо ДНК, должна быть включена при каждом тестировании (вода должна быть пригодна для молекулярно-биологических исследований). Соответствующие тест-стрипы должны показать только полоски CC и AC.

Требования к образцу

В качестве исходного материала для выделения ДНК можно использовать деконтаминированные образцы от пациентов с положительными и отрицательными результатами микроскопии, это может быть мокрота (отделяемое или мокрота), бронхиальный материал (например, бронхо-альвеолярные смывы), или аспираты (например, плевральный аспират), а так же культивированные образцы (плотные/жидкие среды). Перед окончательной редакцией данной инструкции, основные характеристики теста не были валидированы на других образцах, не отмеченных выше.

Меры предосторожности при работе с образцами

Образцы от пациентов и культуры, полученные из образцов пациентов, всегда должны рассматриваться, как инфекционные, и работать с ними следует соответственным образом (см. [3] или [4]). Всегда использовать защитную одежду и перчатки. Образцы от пациентов из группы риска (инфицированные патогенными микроорганизмами и вирусами, включая гепатит B и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)) и культуры, полученные из этих образцов, всегда должны быть промаркированы, и работать с ними необходимо, соблюдая все меры предосторожности, согласно принятым в данном институте правилам.

Со всеми образцами, которые могут содержать микобактерии, следует обращаться, применяя методики Biosafety Level 2 или, когда это указано, методики Biosafety Level 3 (например, см. [3]). Необходимо соблюдать федеральные, государственные и местные законы безопасности труда и охраны окружающей среды.

Сразу же после использования, выбросьте отработанные наконечники пипеток в контейнер для биологически опасных отходов. По окончании исследований, выбросьте все отработанные материалы в контейнер для биологически опасных отходов.

Хранение и транспортировка

Все образцы должны быть собраны и транспортированы согласно рекомендациям публикации CDC «Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory» [5], «Clinical Microbiology Procedures Handbook» [6], или согласно требованиям лабораторной процедуры.

Необходимо строго соблюдать условие, что до проведения деконтаминации, образцы должны храниться в стерильном пластиковом контейнере при температуре от 2°C до 8°C. Транспортировка образцов при комнатной температуре должна быть выполнена в максимально короткие сроки – в течение 1-2 дней [7,8]. Образцы, используемые для деконтаминации, должны быть со сроком не более 4-х дней.

После деконтаминации и последующего ресуспендирования бактериального осадка фосфатным буфером, образцы можно хранить при –20°C или –80°C максимумно – 5 дней до проведения выделения ДНК.

Подготовка

Клинические образцы должны быть обработаны NALC-NaOH по методу, описанному в публикации CDC «Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory» [5]. После деконтаминации, клеточный осадок следует ресуспендировать не более, чем в 1-1,5 мл фосфатного буфера.

При тестировании образцов пациентов, избыточный объем может понизить чувствительность теста. По причине неоднородности материала, деконтаминированный образец необходимо перемешать перед тем, как взять аликвоту; иначе, чувствительность теста может снизиться.

Если образец надо культивировать, культивирование можно проводить как на плотной среде (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook), так и в жидкой среде (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

Обработку потенциально инфекционных образцов надо проводить в вытяжном шкафу II класса безопасности.

Выделение ДНК

Исходным материалом для выделения ДНК могут быть использованы деконтаминированные образцы пациентов, а так же бактериальный рост с плотной среды (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook) или жидкой среды (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

Для выделения ДНК из деконтаминированных NALC-NaOH клинических образцов или культивированного материала, набор **GenoLyse**® kit (см. главу Информация для заказа). Как альтернатива, для автоматизированного выделения ДНК, можно комбинировать **GenoXtract**® и набор для выделения **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (см. главу Информация для заказа). Чтобы получить рекомендации по работе, обратитесь к соответствующей инструкции по применению.

Упомянутые здесь методы были использованы для оценки теста **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Перед окончательной редакцией данной инструкции, основные характеристики теста не были валидированы на других методах выделения ДНК.

Амплификация

Все реагенты, необходимые для амплификации, например, полимеразы или праймеры включены в Амплификационную Смесь А и В (АМ-А и АМ-В) и оптимизированы для данного теста. Перед приготовлением основной смеси быстро разморозьте АМ-А и АМ-В, быстро осадите путем центрифугирования и осторожно перемешайте пипетированием. Пипетируйте АМ-А и АМ-В только в комнате, чистой от контаминирующей ДНК. Во избежание контаминации растворы ДНК следует вносить в отдельном рабочем помещении.

Подготовьте для каждого образца:

После выделения ДНК набором **GenoLyse®**
– 10 мкл АМ-А (см. Состав Комплекта 2)
– 35 мкл АМ-В (см. Состав Комплекта 2)
– 5 мкл раствора ДНК
Конечный объем: 50 мкл

После выделения ДНК набором **GXT DNA/RNA Extraction Kit**
– 10 мкл АМ-А (см. Состав Комплекта 2)
– 35 мкл АМ-В (см. Состав Комплекта 2)
– 10 мкл раствора ДНК
Конечный объем: 55 мкл

Определите общее количество образцов (количество анализируемых проб + контрольные образцы). Подготовьте необходимое количество пробирок. Подготовьте мастер-микс, содержащий АМ-А и АМ-В и аккуратно, но тщательно перемешайте (не на вортексе).

Как альтернатива, содержащее реакционной пробирки АМ-А можно полностью перенести в реакционную пробирку АМ-В. Это доводит мастермикс до для 12 реакций амплификации (набор на 12 тестов) или, соответственно, для 4х 24 реакций амплификации (набор на 96 тестов). Пожалуйста, обратите внимание на то, что мастер микс должен быть свежее-приготовленным каждый раз и его следует сразу использовать. Аликвотируйте по 45 мкл в каждую подготовленную ПЦР-пробирку и добавьте в одну аликвоту 5 или 10 мкл воды (вода должна быть пригодна для молекулярно-биологических исследований; отрицательный контрольный образец). В отдельном помещении добавьте 5 или 10 мкл раствора ДНК в каждую аликвоту (исключение – отрицательный контроль).

Программа ампликации:

При использовании термоциклера от Hain Lifescience с соответствующими предустановками, выберите протокол «MDR DIR» для клинических образцов и протокол «MDR CUL» для культивированных образцов.

	клинические образцы	культивированные образцы
15 мин 95°C	1 цикл	1 цикл
30 сек 95°C } 2 мин 65°C }	20 циклов	10 циклов
25 сек 95°C } 40 сек 50°C } 40 сек 70°C }	30 циклов	20 циклов
8 мин 70°C	1 цикл	1 цикл
Нагрев	≤2,2°C/сек	≤2,2°C/сек

Нагревательная крышка термоциклера должна быть включена в течение всей программы.

Продукты амплификации могут храниться при температуре от –20°C до 8°C.

Гибридизация

При использовании аппарата для гибридизации от Hain Lifescience, пожалуйста, внимательно изучите документ «Overview equipment programs» доступный на сайте www.hain-lifescience.com, для того, чтобы определить наиболее подходящий для использования протокол гибридизации. Следующий протокол описывает мануальную гибридизацию с использованием водяной бани или **TwinCubator**.

Подготовка

Предварительно прогреть водяную баню с шейкером до 45°C (максимально допустимое отклонение температуры ±1°C) или включить **TwinCubator**. Растворы НУВ и STR перед применением нужно предварительно прогреть до 37-45°C. В реагентах не должно быть осадка (при этом обратите внимание, что раствор CON-D опалесцирует). При необходимости перемешать растворы. За исключением CON-C и SUB-C, довести остальные растворы до комнатной температуры. В подходящей пробирке разведите Концентрат Конъюгата (CON-C – оранжевый) и Концентрат Субстрата (SUB-C – желтый) в соотношении 1:100 в соответствующем буфере (**CON-C с CON-D, SUB-C с SUB-D**) в необходимом количестве. Хорошо перемешайте и доведите до комнатной температуры. Из расчета на каждый стрип: добавьте 10 мкл концентрата к 1 мл соответствующего буфера. CON-C разводится перед каждым использованием. Разведенный SUB-C можно хранить 4 недели в защищенном от света месте при комнатной температуре.

- Внесите по 20 мкл Денатурирующего Раствора (DEN, голубого цвета) в угол каждой ячейки.
- Добавьте в раствор по 20 мкл продукта амплификации, перемешайте пипетированием и инкубируйте 5 мин при комнатной температуре.
В это время пинцетом выньте стрипы из тубы и подпишите их карандашом под цветной полосой. При работе со стрипами всегда используйте перчатки!
- Осторожно добавьте в каждую ячейку по 1 мл предварительно нагретого Гибридизационного Буфера (НУВ, зеленого цвета). Аккуратно покачивайте ванночку до получения гомогенного окрашивания.
Следите, чтобы раствор не попал в соседние ячейки.
- Поместите стрипы в ячейки.
Стрипы должны быть полностью погружены в раствор, лицевой стороной (определяемой по цветной полосе на нижнем конце) вверх. Если стрип перевернулся, его нужно поправить пинцетом. Во избежание контаминации тщательно мойте пинцет после каждого применения. Это важно и на всех последующих этапах теста.
- Поместите ванночку на водяную баню с шейкером/TwinCubator и инкубируйте 30 мин при температуре 45°C.
Установите скорость встряхивания водяной бани так, чтобы жидкость постоянно перемешивалась, но не попадала в соседние ячейки. Чтобы установить равномерное распределение температуры, ванночку погружают в воду на 1/3 высоты.
- Полностью аспирируйте Гибридизационный Буфер.
К примеру, можно использовать пастеровскую пипетку, соединенную с вакуумным насосом.
- Добавьте по 1 мл Раствора для Жесткой Промывки (STR, красного цвета) в каждый стрип и инкубируйте 15 мин при 45°C в водяной бане с шейкером/TwinCubator.
- Далее работайте при комнатной температуре.
Полностью удалите раствор для Жесткой Промывки.
Слейте мойущий раствор в контейнер для отходов, а остатки жидкости удалите похлопыванием ванночки по фильтровальной бумаге. Таким же образом поступайте и при следующих этапах отмывки.
- Отмойте каждый стрип в 1 мл Промывающего Раствора (RIN) в течение 1 мин на платформе шейкера/ TwinCubator (слейте RIN после инкубации).
- Добавьте по 1 мл разведенного Конъюгата (см. выше) в каждый стрип и инкубируйте 30 мин на платформе шейкера/ TwinCubator.

11. Удалите раствор и промойте каждый стрип дважды по 1 мин в 1 мл Промывающего Раствора (RIN) и один раз 1 мин примерно в 1 мл дистиллированной воды (используйте флакон для промывки) на платформе шейкера/ TwinCubator (Сливая раствор каждый раз). После последней промывки тщательно удалите все остатки воды.
12. Добавьте по 1 мл разведенного субстрата (см. выше) в каждый стрип и инкубируйте без встряхивания, защищая от света. В зависимости от условий теста (например, температуры в комнате), время инкубации субстрата, а именно время, пока полоски не станут чётко видимыми, может варьировать от 3 до 20 мин. Слишком длительная инкубация может привести к избыточному развитию фоновой окраски, и, тем самым может способствовать неправильной интерпретации результатов.
13. Как только полоски станут чётко видимыми, остановите реакцию быстрым двукратным промыванием дистиллированной водой.
14. Пинцетом удалите стрипы из ванночки и высушите их между двумя слоями фильтровальной бумаги.

Оценка и интерпретация результатов

Подклейте стрипы и храните в защищенном от света месте. Эталон для оценки поставляется в наборе. При использовании этого эталона оценки, наклейте окрашенные стрипы в предназначенные для этого поля, причем полоски СС и АС должны совпадать с соответствующими линиями на эталоне. По техническим причинам расстояние между отдельными пробами может немного отличаться. **Поэтому для точной оценки результатов необходимо применять специально поставляемый шаблон, приведя в соответствие его полосы так, чтобы они совпадали с отдельными полосами каждого локуса, соответствуя линии Локус Контроля.** Определите степень устойчивости и сделайте пометку в соответствующей колонке. Некоторые примеры интерпретации полученных результатов приведены в следующей главе. На каждом стрипе всего 27 зоны реакции (см. рис.).

.....	Контроль конъюгата [CC]
.....	Зона Контроля Амплификации [AC]
.....	Комплекс <i>M. tuberculosis</i> [TUB]
.....	<i>rpoB</i> Контроль Локуса [<i>rpoB</i>]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 1 [<i>rpoB</i> WT1]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 2 [<i>rpoB</i> WT2]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 3 [<i>rpoB</i> WT3]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 4 [<i>rpoB</i> WT4]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 5 [<i>rpoB</i> WT5]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 6 [<i>rpoB</i> WT6]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 7 [<i>rpoB</i> WT7]
.....	<i>rpoB</i> проба дикого типа 8 [<i>rpoB</i> WT8]
.....	<i>rpoB</i> мутантная проба 1 [<i>rpoB</i> MUT1]
.....	<i>rpoB</i> мутантная проба 2A [<i>rpoB</i> MUT2A]
.....	<i>rpoB</i> мутантная проба 2B [<i>rpoB</i> MUT2B]
.....	<i>rpoB</i> мутантная проба 3 [<i>rpoB</i> MUT3]
.....	<i>katG</i> Контроль Локуса [<i>katG</i>]
.....	<i>katG</i> проба дикого типа [<i>katG</i> WT]
.....	<i>katG</i> мутантная проба 1 [<i>katG</i> MUT1]
.....	<i>katG</i> мутантная проба 2 [<i>katG</i> MUT2]
.....	<i>inhA</i> Контроль Локуса [<i>inhA</i>]
.....	<i>inhA</i> проба дикого типа 1 [<i>inhA</i> WT1]
.....	<i>inhA</i> проба дикого типа 2 [<i>inhA</i> WT2]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 1 [<i>inhA</i> MUT1]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 2 [<i>inhA</i> MUT2]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 3A [<i>inhA</i> MUT3A]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 3B [<i>inhA</i> MUT3B]
.....	цветовая маркировка

Обратите внимание: Стрип изображен не в натуральную величину.

Контроль Конъюгата (CC)

В этой зоне должна быть хорошо проявлена линия, подтверждающая эффективность связывания конъюгата и правильность субстратной реакции.

Зона Контроля Амплификации (AC)

Если тест выполнен правильно, контроль ампликонов, свяжется с Зоной Контроля Амплификации на стрипе. Только полоски с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Контроля Амплификации (AC), могут приниматься во внимание.

В случае положительного результата тестирования, сигнал в зоне Контроля Амплификации может быть слабым или совсем невидимым. Это может быть вызвано конкурентными реакциями во время амплификации. В этом случае, тестирование считается выполненным правильно и не требует повторения.

Если развились только полоски СС и АС, это значит, что отрицательный результат верен. Отсутствие полоски АС в случае отрицательного результата, указывает на ошибку во время проведения амплификации в процессе настройки и/или при выполнении реакции амплификации, или на присутствие ингибиторов амплификации. В этом случае результаты тестирования недействительны и необходимо повторное тестирование соответствующего образца. В случае наличия общей сильной интенсивности сигнала, но при наличии только слабого окрашивания или при отсутствии полосы Контроля Амплификации, нельзя оценить одну полосу дикого типа, демонстрирующую значительно более слабое окрашивание, чем другие полосы дикого типа соответствующего локуса (или полосы Контроля Локуса для *katG*).

Комплекс *M. tuberculosis* (TUB)

Эта зона гибридизируется с ампликонами, полученными от всех представителей комплекса *M. tuberculosis*. Если зона TUB отрицательная и, в то же время, полоска оценки устойчивости не развивается так, чтобы её можно было учесть, это означает, что в тестируемом образце не содержатся бактерии, относящиеся к комплексу *M. tuberculosis* и образец не может быть проверен данной тест-системой. В редких случаях зона TUB может быть отрицательной с одновременным развитием полоски устойчивости, которую можно учитывать. В таком случае, можно заподозрить присутствие штамма, принадлежащего к комплексу *M. tuberculosis*, и должно быть выполнено повторное тестирование (см. ниже «особые случаи», п.3).

Контроли локусов (*rpoB*, *katG* и *inhA*)

Зоны Контроля Локусов улавливают специфичные для каждого локуса участки генов. В случае положительного результата тестирования, (видимая полоска в диапазоне дикого типа и мутантного образца) сигнал в зоне Локус Контроля может быть слабым.

Пробы дикого типа

Пробы дикого типа охватывают важнейшие участки устойчивости каждого гена (см. рис. 1, а так же таб. 1, 2 и 3). Если все пробы дикого типа одного гена показывают положительный сигнал, значит в нуклеотидной последовательности не зафиксировано ни одной мутации. Это свидетельствует о том, что тестируемый штамм чувствителен к соответствующим антибиотикам.

В случае мутации, определённые ампликоны не могут связаться с соответствующими пробами диких типов. Отсутствие сигнала хотя бы в одной пробе дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма к соответствующим антибиотикам.

Каждый образец полоски, отличный от образца полоски дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма. Полоска, проявившаяся в зоне гена *rpoB* говорит об устойчивости тестируемого штамма к рифамицину, полоска в зоне гена *katG* и *inhA* позволяет сделать выводы об устойчивости тестируемого штамма к изониазиду.

Мутантные пробы

Мутантные пробы выявляют наиболее часто встречаемые мутации, вызывающие устойчивость. (см. Таб. 1, 2 и 3). В сравнении с другими пробами, положительные сигналы в мутантных пробах *groB* MUT2A и MUT2B могут проявлять сигнал меньшей интенсивности. В редких случаях, когда полоска *groB* MUT3 положительная, слабое окрашивание наблюдаемое в полоске *groB* WT8, считается отрицательным. Каждая полоска, отличающаяся от полосок дикого типа, указывает на устойчивость тестируемого штамма. Образцовая полоска, появившаяся в пробе *groB*, позволяет сделать вывод об устойчивости исследуемого штамма к рифампицину, появление полоски *katG* – и *inhA* – об устойчивости к изониазиду.

Пожалуйста, обратите внимание:

Только полоски с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Контроля Амплификации (AC), могут приниматься во внимание.

Не все полоски на стрипе могут показывать одинаковую силу сигнала.

Обратите внимание на следующие особые случаи :

1. Существует вероятность того, что в исследуемом образце содержатся гетерорезистентные штаммы. При гетерорезистентности, в соответствующих образцах можно определить последовательности как мутантных, так и диких типов; следовательно, на стрипах может проявиться как одна из мутантных проб, так и соответствующая проба дикого типа. Будет ли соответствующая резистентность фенотипически обусловленной, зависит от соотношения мутантных и не-мутантных последовательностей в данном исследовании.
2. Возможны ситуации, когда, исследуемый образец одновременно содержит несколько штаммов комплекса *M. tuberculosis* (смешанная культура или контаминация). Если хотя бы один из штаммов имеет мутацию, то положительно окраситься может полоска, как в мутантной пробе, так и в соответствующей пробе дикого типа. Будет ли соответствующая резистентность фенотипически обусловленной, в данном исследовании зависит от соотношения устойчивых и чувствительных штаммов
3. Существует вероятность того, что по причине микс-инфекции в тестируемом образце содержится как комплекс *M. tuberculosis*, так и не туберкулёзные микобактерии. В редких случаях полоска TUB может отсутствовать из-за конкуренции единичных реакций амплификации в процессе ПЦР. Однако, если развивается полоска устойчивости, которую можно учесть, возникает подозрение на присутствие штаммов, относящихся к *M. tuberculosis* комплексу и требуется повторное тестирование.
4. В редких случаях все полоски локуса гена (включая и полоску Локус Контроля), могут полностью отсутствовать на тестовом стрипе. Если такой результат получен в клиническом образце, возможной причиной, (но не единственной) может быть то, что концентрация ДНК в образце ниже предела детекции или в образце присутствуют интерферирующие вещества. Такого вида полоску нельзя оценивать и тестирование необходимо повторить.
Если в культивированных образцах получились результаты с полным отсутствием локуса *katG*, это указывает на INH резистентность исследуемого штамма.

Регионы устойчивости и мутации, опосредствующие общую устойчивость

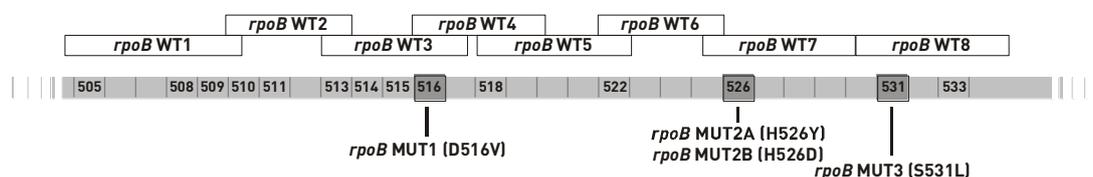


Рис 1: Области устойчивости к рифампицину гена *groB*

groB WT1-8: *groB* - зоны дикого типа; *groB* MUT1-3: *groB*-зоны мутаций.

Числа указывают положения аминокислот (кодонов) для всех мутаций, перечисленных в таблице. Кодоны, для которых разработаны мутантные пробы, выделены.

Таблица 1: Мутации в гене *groB* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски (согласно [9]).

слабые полоски дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>groB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>groB</i> WT2	510-513		Q510H L511P*
<i>groB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>groB</i> WT3/WT4	513-519	<i>groB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>groB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>groB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>groB</i> WT7	526-529	<i>groB</i> MUT2A <i>groB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>groB</i> WT8	530-533	<i>groB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

* Эти редкие мутации были выявлены пока только теоретически (in silico).

Таблица 2: Мутации в гене *katG* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски.

слабые полоски дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Таблица 3: Мутации в области промотора *inhA* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски.

слабые полоски дикого типа	исследованные положения аминокислот	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

Примеры интерпретации результатов

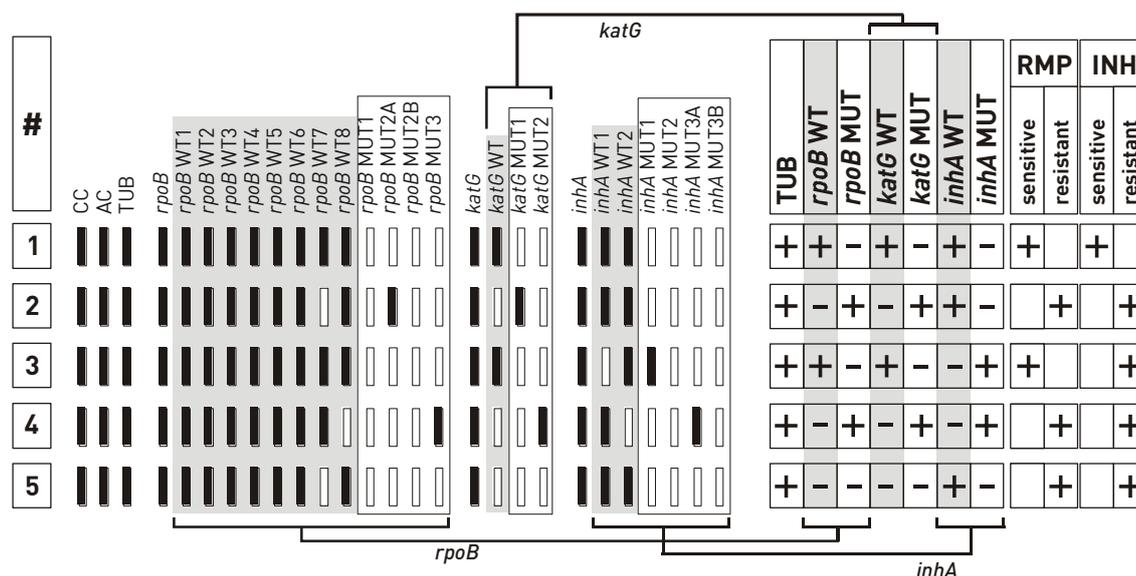


Рис. 2: Примеры образцовых полосок и их интерпретации относительно устойчивости к рифампицину и/или изониазиду.

Если все полоски дикого типа показывают окрашивание, то это оценивается как положительный результат, и отмечается в колонке WT (ДТ) соответствующего гена, как «+». Если отсутствует хотя бы одна из полосок дикого типа, то это оценивается как отрицательный результат и отмечается в колонке WT (ДТ) этого гена, как «-». Отрицательную пометку можно поставить в колонке мутаций, только если ни одна из мутантных полосок не проявилась. Если хотя бы одна из мутантных полосок окрасилась, то результат расценивается как положительный и колонка MUT соответственного гена обозначается, как «+».

Далее – пояснения к двум, вышеуказанным примерам:

В примере 1 показаны полоски дикого типа. Сигнал есть во всех пробах дикого типа, но отсутствует в мутантных пробах. Поэтому на оценочной карте стоит «+» в трёх колонках дикого типа и «-» в трёх колонках мутантного типа. Соответственно, ячейки «RMP sensitive» и «INH sensitive» помечаются, как «+».

В примере 5 одна из проб дикого типа *rpoB* и *katG* отсутствует, поэтому ячейки *rpoB* WT и *katG* WT помечаются «-». Поскольку нет развития окрашивания ни в одной из мутантных проб, то эти ячейки тоже помечаются, как «-». Область промотора *inhA* не отличается от образцов дикого типа. Штамм оценивается, как RMP- и INH устойчивый.

Ограничения метода

Чтобы получить правильные результаты и избежать контаминации, строго придерживайтесь установленного протокола и процедуры тестирования.

Этот тест может проводиться только обученным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами.

Данный тест отражает знания, накопленные на сегодняшний день компанией Hain Lifescience.

Как и любая методика, основанная на ДНК, данный тест лишь обеспечивает скрининг последовательностей нуклеиновых кислот, а не аминокислот. В связи с этим возможно, что мутации в области пробы, не приводящие к замене аминокислот (молчащие мутации), тем не менее, ведут к отсутствию одной из полосок дикого типа. В редких случаях была замечена молчащая мутация в кодоне 514 гена *rpoB*, ведущая к отсутствию полоски *rpoB* WT3 [10]. Таким образом, если выявленная устойчивость обусловлена исключительно пропущенной *rpoB* WT3, то следует принимать во внимание результаты фенотипической устойчивости.

Появились публикации о дополнительных мутациях в пределах области тестируемого гена *rpoB* [11], приводящих к устойчивости к рифампицину. Поскольку эти мутации очень редки, то невозможно было их подтвердить на данной тест-системе, они были установлены только *in silico*.

Тест **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 определяет устойчивость комплекса *M. tuberculosis* только в тех случаях, когда её происхождение связано с наличием мутаций в участках генах *rpoB*, *katG* и *inhA*. Резистентность, вызванная мутациями других генов или областями генов, так же как и другие механизмы устойчивости к рифампицину и изониазиду, в данной тест-системе не выявляются.

Теоретически, устойчивость может иметь место, не смотря на дикий тип. Если исследуемый образец содержит штамм, проявляющий гетерорезистентность и резистентность, обусловлена мутацией, не включённой в мутантные пробы, то проявится полоска в диких типах. Аналогично, если в образце содержится более чем один штамм *M. tuberculosis*, (по причине смешанной культуры или контаминации) и один из них не включён в мутантные пробы, также проявится полоска в диких типах.

Как и любой метод выявления ДНК, рутинные тест-системы улавливают ДНК из жизнеспособных и нежизнеспособных бактерий. Таким образом, **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 тест, не может быть использован для мониторинга прогрессирования или успешности лечения пациентов, находящихся на антимикробной терапии.

GenoType MTBDRplus VER 2.0 выдаёт качественные результаты. Интенсивность полосок на стрипах не даёт информации о количестве клеток в положительных образцах.

Присутствие нескольких видов бактерий в анализируемом образце может помешать правильной интерпретации теста.

Микроорганизмы, относящиеся к комплексу МТВ, не могут быть дифференцированы.

Данный тест работает только в пределах участка генома, из которого были выбраны праймеры и зонды.

Как и в любой системе детекции на основе гибридизации, в данной тест-системе допускается возможность того, что вариации последовательности в участке генома, для которого выбраны праймеры и пробы, но для детекции которых тест-система не предназначена, могут привести к ложным результатам. По причине высокой вариабельности бактериального генома, возможно, что определенные подтипы не будут распознаны.

Оценка технических характеристик для данного исследования была выполнена с использованием набора **GenoLyse**® для выделения ДНК из деконтаминированной положительной мокроты и отрицательных образцов пациентов, а так же культивированных образцов с использованием набора **GXT DNA/RNA Extraction Kit** для автоматического выделения ДНК из деконтаминированных клинических образцов. До появления данной редакции рабочей инструкции, технические характеристики теста не были валидированы для других методов выделения ДНК или материалов образцов.

Результаты тестирования должны интерпретироваться совместно с результатами других лабораторных исследований и клинических данных, доступных для лечащего врача. К тому же, в некоторых случаях следует принимать во внимание результаты определения фенотипической резистентности.

Пользователи данной тест-системы должны иметь информацию о распределении локальных мутаций генов, выявляемых данным тестом или запросить её. Может понадобиться подтверждение результатов теста путём выявления фенотипической резистентности.

Решение проблем

Сплошные слабые сигналы или отсутствие сигналов (включая зону Контроля Конъюгата)

- Комнатная температура слишком низкая или реактивы не доведены до комнатной температуры.
- Отсутствует или в недостаточном количестве внесён CON-C и/или SUB-C.

Повторите этап реверс-гибридизации.

Слабые сигналы или их отсутствие за исключением зоны Контроля Конъюгата

- Качество выделенной ДНК оказалось несоответствующим для проведения реакции амплификации. Повторите выделение.
- Амплификационные Смеси (AM-A и AM-B) недостаточно хорошо перемешаны или добавлены в ошибочном количестве. Подготовьте новый мастер микс и повторите амплификацию.
- Температура инкубации слишком высокая. Повторите этап реверс-гибридизации.

Негомогенное окрашивание

- Во время инкубации, стрипы не были полностью погружены в раствор.
- Ванночка недостаточно встряхивалась.

Повторите этап реверс-гибридизации.

Сильное фоновое окрашивание

- Использовались слишком концентрированные растворы CON-C и/или SUB-C
- Этапы промывки не были выполнены соответствующим образом
- Отмывающие растворы слишком холодные

Повторите этап реверс-гибридизации.

Неожиданный результат

- Неверная температура инкубации.
- Гибридизационный Буфер и/или Раствор для Жесткой Промывки недостаточно нагреты или перемешаны.
- Контаминация между соседними ячейками во время добавления Гибридизационного Буфера.
Повторите этап реверс-гибридизации.
- Контаминация выделенной ДНК фрагментами ДНК, выделенной или амплифицированной ранее. Повторите выделение.
- Контаминация реагентов для амплификации. В этом случае, отрицательный контроль образца проявится в виде дополнительной полоски возле СС и АС. Повторите амплификацию с новыми реагентами.
- В зависимости от количества введенной амплифицированной ДНК и специальных условий реакции, может происходить интенсивное окрашивание и быстрое развитие цветной реакции. В таких случаях, остановите инкубацию, как только полосы станут видимы, чтобы предотвратить развитие перекрёстно-гибридизированных полос.
- Исходный материал не является чистой культурой. Повторите культивирование, чтобы исключить контаминацию.
- Неправильное взятие образца, его хранение и транспортировка, или неправильная подготовка образца. Запросите новый образец и повторите тестирование.
- Ошибка на этапе выделения ДНК. Повторите выделение.

Информация для заказа

Hain Lifescience	Номер для заказа
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (набор для анализа 12 образцов)	304A
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (набор для анализа 96 образцов)	30496A
GenoLyse ® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 12 образцов)	51612
GenoLyse ® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 96 образцов)	51610
GXT DNA/RNA Extraction Kit (набор для автоматизированного выделения ДНК/РНК с использованием GenoXtract ®, рассчитан на 96 образцов)	12.01.02
GenoXtract ® (Аппарат для выделения нуклеиновых кислот, обрабатывающий до 12 образцов)	8.31.01
Sarstedt, Nümbrecht, Германия	Номер для заказа
0,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками	72.730.105
1,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками	72.692.005

Технические характеристики

Диагностическая характеристика

Клинические легочные образцы

Диагностически значимые технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 были определены в процессе изучения [12] 338 образцов (включая мокроту, бронхо-альвеолярные смывы и плевральные аспираты) в сравнении с культурой (успешное культивирование на плотной среде Loewenstein-Jensen или на MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA), с последующим определением вида при помощи набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0) и проверка фенотипической лекарственной чувствительности (drug susceptibility testing - (DST)).

Дополнительно эти образцы были проверены микроскопически. При оценке принимались во внимание и клинические данные пациента.

Сайт изучения находился в стране с высокой нагрузкой туберкулезом с множественной лекарственной резистентностью (MDR-TB). На месте проводились методы микроскопии и культивирования. Аликвоты образцов мокроты, деконтаминированной, были направлены во вторую лабораторию, для выполнения экстракции ДНК и **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Мануальное выделение ДНК проводилось набором **GenoLyse**® kit (162 из 338 образцов мокроты), автоматизированное выделение ДНК было выполнено на **GenoXtract**® с использованием набора **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (176 из 338 образцов мокроты) согласно соответствующим инструкциям по применению.

Конгруэнтные положительные и клинически положительные результаты **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 были определены либо по положительности культуры и **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 или только по тому, что **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 был положительным, а культура отрицательной, но ТБ был выявлен предыдущими исследованиями, основанными на культивировании в образцах от соответствующих пациентов. Противоречивые результаты (**GenoType MTBDRplus** VER 2.0 положительный, а культура – отрицательный) не исключают во всех случаях ТБ инфекцию у пациентов, поскольку у некоторых пациентов не были доступны данные о возможности ТБ инфекции.

Таблица 1: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления **MTBC** в легочных клинических образцах в сравнении с культурой/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Мусо CM) и клинические данные

		Положительная мокрота				
		культура/GT Мусо CM и клин				
		положительные	отрицательные			
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	положительные	39	0	Чувств: 100%	Спец: /*
		отрицательные	0	1	ППЗ: 100%	ПОЗ: /*
		Отрицательная мокрота				
		культура/GT Мусо CM и клин				
		положительные	отрицательные			
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	положительные	49	1	Чувств: 80,3%	Спец: 98,4%
		отрицательные	12	60	ППЗ: 98,0%	ПОЗ: 83,3%
		Положительная мокрота				
		культура/GT Мусо CM и клин				
		положительные	отрицательные			
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	положительные	39	1	Чувств: 97,5%	Спец: /*
		отрицательные	1	0	ППЗ: 97,5%	ПОЗ: /*
		Отрицательная мокрота				
		культура/GT Мусо CM и клин				
		положительные	отрицательные			
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	положительные	47	3	Чувств: 78,3%	Спец: 96,0%
		отрицательные	13	72	ППЗ: 94,0%	ПОЗ: 84,7%

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение;

ПОЗ, предварительно отрицательное значение

* Нет значения по причине малого количества проб

Для оценки выявленной резистентности, было использовано 156 образцов (78 **GenoLyse**® изолятов и 78 **GXT** изолятов) которые оказались **MTBC**-положительными и при культивировании и на наборе **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Таблица 2: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления **RMP резистентности** в пульмонарных образцах в сравнении с культурой/DST

		Положительная мокрота					Отрицательная мокрота				
		культура/DST					культура/DST				
		RMP-R	RMP-S				RMP-R	RMP-S			
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	RMP-R	25	1	Чувств: 100%	Спец: 92,3%	RMP-R	24	1	Чувств: 96,0%	Спец: 93,3%
		RMP-S	0	12	ППЗ: 96,2%	ПОЗ: 100%	RMP-S	1	14	ППЗ: 96,0%	ПОЗ: 93,3%
		культура/DST					культура/DST				
		RMP-R	RMP-S				RMP-R	RMP-S			
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	RMP-R	26	0	Чувств: 96,3%	Спец: 100%	RMP-R	25	0	Чувств: 86,2%	Спец: 100%
		RMP-S	1	12	ППЗ: 100%	ПОЗ: 92,3%	RMP-S	4	10	ППЗ: 100%	ПОЗ: 71,4%

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение;

ПОЗ, предварительно отрицательное значение; RMP-R, резистентность к рифампицину; RMP-S, чувствительность к рифампицину

Таблица 3: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления INH резистентности в пульмонарных клинических образцах в сравнении с культурой/DST

	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Положительная мокрота			Чувств: 96,7% Спец: 87,5% ППЗ: 96,7% ПОЗ: 87,5%	Отрицательная мокрота			Чувств: 96,7% Спец: 90,0% ППЗ: 96,6% ПОЗ: 90,0%
		культура/DST				культура/DST			
		INH-R	INH-S			INH-R	INH-S		
GenoLyse®		29	1	7		29	1	9	
GXT		28	0	11	Чувств: 100% Спец: 100% ППЗ: 100% ПОЗ: 100%	29	2	5	Чувств: 90,6% Спец: 71,4% ППЗ: 93,5% ПОЗ: 62,5%

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение; INH-R, резистентность к изониазиду; INH-S, чувствительность к изониазиду

Культуральный материал

Диагностически значимые технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 были определены в процессе изучения 74 культивированных образцов в сравнении с **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 и проверкой фенотипической лекарственной чувствительности (drug susceptibility testing - (DST)). Сайт изучения находился в стране с низкой нагрузкой MDR-TB. Мануальное выделение ДНК проводилось набором **GenoLyse®** китв соответствие с инструкцией по применению. Было проверено 74 культуры, 49 оказались положительными на комплекс *M. tuberculosis* complex (MTBC) и на 25 появился пророст не-туберкулезных микобактерий. Таким образом, для выявления резистентности в культивированном материале, было доступно 49 изолятов.

Таблица 4: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления MTBC в культивированном материале в сравнении с культурой/GenoType **Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Мусо CM)

GenoType MTBDRplus VER 2.0	культура/GT Мусо CM		Чувств: 100% Спец: 100% ППЗ: 100% ПОЗ: 100%
	положительные отрицательные		
	положительные	отрицательные	
	49	0	
	0	25	

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение

Таблица 5: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления RMP резистентности в культивированном материале в сравнении с культурой/DST

GenoType MTBDRplus VER 2.0	культура/DST		Чувств: /* Спец: 100% ППЗ: /* NPV: 100%
	RMP-R	RMP-S	
	0	0	
0	49		

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение; RMP-R, резистентность к рифампицину; RMP-S, чувствительность к рифампицину

* Нет значения по причине малого количества проб.

Таблица 6: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** для выявления INH резистентности в культивированном материале в сравнении с культурой/DST

GenoType MTBDRplus VER 2.0	культура/DST		Чувств: /* Спец: 100% ППЗ: /* NPV: 100%
	INH-R	INH-S	
	3	0	
0	46		

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение; INH-R, резистентность к изониазиду; INH-S, чувствительность к изониазиду.

* Нет значения по причине малого количества проб.

Аналитические характеристики

Аналитическая специфичность

Специфичность теста **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 обеспечена за счёт точного дизайна и специфичных праймеров и зондов, которые сочетаются помимо прочего по сравнению гомологичности последовательностей, опубликованной в генетической базе данных и по строгим условиям реакции.

Аналитическая специфичность была определена на 61 ДНК изолятах, включая следующие MTBC штаммы: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, и *M. pinnipedii* (все RMP- и INH-чувствительные). Были проанализированы следующие штаммы, неулавливаемые системой: *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. bovis*, *C. durum*, *Escherichia coli*, *Gordona rubropertinctus*, *Klebsiella oxytoca*, *Mycobacterium abscessus*, *M. alvei*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. chimaera*, *M. fortuitum* (2 sequevars), *M. frederiksbergense*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. heckeshornense*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. palustre*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, MRSA, *Nocardia abscessus*, *N. africana*, *N. amarae*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharomonospora glauca*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Tsakamurella inchonensis*, *T. pulmonis*.

Шесть изолятов MTBC были правильно идентифицированы, как RMP- и INH-чувствительные MTBC штаммы. Остальные 55 изолятов показали отсутствие TUB полоски и неочениваемую полоску для RMP и INH резистентности. Поэтому достигнутая аналитическая специфичность оказалась 100%.

Аналитическая чувствительность (Предел детекции, LOD)

Для определения аналитической чувствительности набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 в клинических образцах, десять параллельных культур БЦЖ были разбавлены и обогащены в МТВС-отрицательных образцах (конечные концентрации в образцах мокроты: 1000, 500, 160 и 100 КОЕ/мл). Включительно с отрицательным контролем, выделение ДНК проводили на наборе **GenoLyse**® и один раз использовали **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, после чего тестировали на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, применяя протокол «MDR DIR» ПЦР. Предел детекции 160 КОЕ/мл был установлен на обоих методах экстракции.

Для определения аналитической чувствительности набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 в культуральных образцах, 4 BCG культуры (RMP- и INH-чувствительных, $1,6 \times 10^4$, $1,6 \times 10^3$, $1,6 \times 10^2$, и 100 КОЕ/мл) были проверены в трёх повторностях. Включительно с отрицательным контролем, выделение ДНК проводили на наборе **GenoLyse**® и тестировали на наборе **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 применяя протокол «MDR CUL» ПЦР. Был установлен предел детекции $1,6 \times 10^4$ КОЕ/мл.

Воспроизводимость

Для того чтобы определить внутри-лабораторную точность, **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, две культуры BCG (RMP- и INH-чувствительные, 1 500 и 150 КОЕ/мл) и культура *M. avium* (10 000 КОЕ/мл) были протестированы в трёх повторностях, и использовались для обогащения отрицательных образцов мокроты. Эти образцы и отрицательный контроль тестировались на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 в похожих условиях, с использованием протокола «MDR DIR» ПЦР. Выделение ДНК выполнялось один раз на **GenoLyse**® DNA extraction kit, и один раз с использованием **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. Все параллельные реплики продемонстрировали появление идентичных и правильных полосок и сравнимую интенсивность сигнала. Более того: интенсивность сигнала была сравнима между двумя методами выделения ДНК и между разными разведениями одного и того же образца. Таким образом, достигнутая внутри-лабораторная точность оказалась 100%.

Для того чтобы определить меж-лабораторную точность **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, две культуры BCG (RMP- и INH-чувствительные, 1 500 и 150 КОЕ/мл) и культура *M. avium* (10 000 КОЕ/мл) были протестированы в трёх повторностях, и использовались для обогащения отрицательных образцов мокроты. Эти образцы и отрицательный контроль тестировались в девяти прогонах: в течение трёх разных дней, на трёх разных наборах аппаратов, и выполняли их три разных оператора. Выделение ДНК выполнялось один раз на **GenoLyse**® DNA extraction kit, и один раз с использованием **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. Для ПЦР использовался протокол «MDR DIR» ПЦР. Помимо варьирующего параметра, все остальные условия тестирования были идентичными. Не было выявлено отклонений между параллельными образцами, т.е. полоски между прогонами были идентичными и правильными и интенсивность сигнала – сравнимая. Более того, интенсивность сигнала оказалась сравнимой между различными методами выделения ДНК и разными концентрациями бактерий. Таким образом, достигнутая меж-лабораторная точность оказалась 100%

Интерферирующие вещества

Есть вещества, которые могут ингибировать ПЦР реакции. Такие ингибиторы могут быть к примеру, происхождением из культуральной среды. Чтобы понять, влияет ли среда на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, 6 разных образцов комплекса *M. tuberculosis* (4 RMP- и INH-резистентных, 2 RMP- и INH-чувствительных) были культивированы на 4 разных средах (плотная среда: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, и Middlebrook-7H10, жидкая среда: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). ДНК выделяли из культуральных образцов, используя набор **GenoLyse**® DNA extraction kit и за тем тестировали набором **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Все образцы комплекса *M. tuberculosis* продемонстрировали одинаковые правильные результаты. Таким образом, можно исключить, что тестируемая среда переносит ингибиторы в тест **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Из материала образцов, так же могут переноситься ингибирующие вещества. Таким образом, вещества, перечисленные в таблице 7, были проверены, на предмет потенциальной интерференции с набором **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Определённые разведения BCG культуры выше и в пределах детекции были обогащены различными количествами потенциальных ингибиторов. Во всех образцах проводили выделение ДНК с использованием **GenoLyse**® DNA extraction kit. Тогда разведения культур были протестированы на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Таблица 7: Протестированные потенциально интерферирующие с **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 вещества

Вещество/класс	Описание/Активный компонент	Тестовая концентрация (ии)
Средства лечения аллергии	Масло чайного дерева	0,008% об/об до 0,5% об/об
Анестетики (эндотрахеальная интубация)	Лидокаин HCl 4%	20% об/об; 30% об/об
Анестетики (оральные)	Бензокаин 20%	5% в/об
Антибиотики (мази для носа)	Мупирицин	1,2 мг/мл; 2,4 мг/мл
Антибиотики (синтетические)	Амоксициллин	2,2 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Изониазид 1 мг/мл	50 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Рифампицин 1 мг/мл	25 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Пиразинамид 10 мг/мл	100 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Этамбутол 1 мг/мл	5 µг/мл; 50 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Стрептомицин 1 мг/мл	25 µг/мл
Противовирусные препараты	Цанамивир	800 µг/мл
Кровь	Цельная кровь	0,2% об/об до 5% об/об
Кровь	Гемоглобин	0,05% об/об to 0,3% об/об
Бронхорасширители	Теофиллин	222 пмоль/мл
ДНК (человека)		10 µг/мл
Отхаркивающие (оральные)	Гуаифенезин 400 мг/пил	2,5 мг/мл; 5 мг/мл
Желудочный сок	0,5% HCl, 0,1 M KCl, 0,1 M NaCl, pH 1-2	5% об/об
Вакцина против гриппа назальный спрей (FluMist®)	Живая аттенуированная вакцина против гриппа	5% об/об
Ингаляционные бронхорасширители	Сальбутамол сульфат 2,5 мг/3 мл	50 µг/мл; 100 µг/мл
Растворы для полоскания рта/горла	Листерин (эукалиптол 0,029%, ментол 0,042%, метилсалицилат 0,06%, тимол 0,064%, денатурированный спирт 20%)	20% об/об
Муцин: бычий, подчелюстной железы, тип I-S	Очищенный белок муцин 5% в/об	1,5% в/об; 5% в/об
Назальные кортикостероиды	Дексаметазон	1,52 пмоль/мл
Назальный гель (гомеопатический)	Сера	5% в/об
Назальный спрей или капли	Фенилэфрин 0,5%	25% об/об; 100% об/об
Раствор для небулайзера (гипертонический раствор)	NaCl	3% в/об; 5% в/об
Физиологический раствор	NaCl (0,9%)	0,9% в/об
Препараты для лечения от <i>Pneumocystis jiroveci</i>	Пентамидин	300 нг/мл
Гной		0,2% об/об до 5% об/об
Реагенты для обработки образца	NALC-NaOH (N-ацетил-l-цистеин-натрия гидрохлорид)	0,5% об/об; 1% об/об
Табак	Никогель (40% экстракт табака)	0,5% в/об

Ингибция GenoType MTBDRplus VER 2.0 (недействительные результаты тестирования) была отмечена в присутствии следующих веществ и в ниже указанных концентрациях: цельная кровь при 0,6%, гемоглобин при 0,1%, гной при 2%, лидокаин при 30%, мупирицин при 2,4 мг/мл, масло чайного дерева при 0,5%, и гуафенизин при 5 мг/мл.

Стабильность

Срок годности тестового набора при рекомендуемых условиях хранения указан на упаковке.
Стабильность определялась согласно требованиям DIN EN ISO 23640.

Список литературы

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. WHO/HTM/TB/2018.20 World Health Organization, Geneva, Switzerland 2018.
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1320–1330.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
5. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
6. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
7. Richter E, Beer J, Diel R, Hillemann D, Hoffmann H, Klotz M, Mauch H, Rüscher-Gerdes S. MiQ 5, Tuberkulose, Mykobakteriose. In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (eds): Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards. Elsevier, Munich, Germany 2010.
8. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (ed). DIN 58943-4:2009-02: Medical microbiology - Diagnosis of tuberculosis - Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria – Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage. Beuth, Berlin, Germany 2009.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993, 341: 647-650.
10. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2688-2690.
11. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 496-514.
12. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances. *J Clin Microbiol* 2012; Epub ahead of print, doi:10.1128/JCM.05903-11.

Важные изменения в инструкции IFU-304A-09

Глава	Изменения
Реагенты и инструменты, Информация для заказа	Следует избегать замораживания и оттаивания составляющих набора более четырех раз. В случае необходимости аликвотируйте реагенты, используя подходящие пробирки с закручивающимися крышками.
Оценка и интерпретация результатов	Новое: „В случае наличия общей сильной интенсивности сигнала, но при наличии только слабого окрашивания или при отсутствии полосы Контроля Амплификации, нельзя оценить одну полосу дикого типа, демонстрирующую значительно более слабое окрашивание, чем другие полосы дикого типа соответствующего локуса (или полосы Контроля Локуса для <i>katG</i>).“

