

GenoType Mycobacterium CM

VER 2.0

Руководство к пользованию

IFU-299A-03

CE

IVD

только для диагностики in vitro

2021-08-09



GenoType Mycobacterium CM VER 2.0

Молекулярно-генетическое исследование для индентификации клинически важных видов микобактерий выделенных из культурального материала

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

Предназначение

GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 - это качественный *in vitro* тест для идентификации комплекса *Mycobacterium tuberculosis*, а так же следующих нетуберкулёзных микобактерий из культурального материала: *M. avium*, *M. chelonae*, комплекс *M. abscessus*, группы *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans* и *M. xenopi*.

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

Резюме и пояснения

Микобактериозы – это инфекционные заболевания, вызванные бактериями рода *Mycobacterium*. Наиболее значимым является туберкулёз (ТБ), который вызывается представителями комплекса *Mycobacterium tuberculosis*. В 2019, в мире было зарегистрировано приблизительно 10 миллионов случаев ТБ, и приблизительно 1,4 миллиона смертельных исхода. [1].

Патогены ТБ – это неподвижные, облигатные, аэробные, кислотоустойчивые бациллы, принадлежащие семейству *Mycobacteriaceae*. Они грамположительны и отличаются высоким содержанием геномных G+C (59-66%). Род *Mycobacterium* объединяет многочисленные виды, которые можно подразделить на 3 группы: (i) комплекс *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, и *M. pinnipedii*), (ii) *M. leprae* вызывающие лепру, и (iii) атипичные или нетуберкулёзные микобактерии (NTM). В связи с различной степенью патогенности и непатогенности некоторых видов, быстрая и точная идентификация комплекса *M. tuberculosis* и последующая его дифференциация от NTM – является наиважнейшей задачей.

NTM могут вызвать хронические микобактериозы. Инфекционность и симптомы в значительной степени варьируемы и зависят как от патогена, так и от состояния иммунного статуса поражённого лица [2]. У лиц с иммуносупрессией, как, например, у ВИЧ – инфицированных или у пациентов с лейкопенией, наиболее вероятно развитие тяжёлых форм микобактериоза.

Набор GenoType Mycobacterium CM позволяет проводить быструю и достоверную дифференциацию соответствующих микобактерий и, т.о., ускорить назначение специфического лечения и предпринять превентивные меры. Если не было возможности идентифицировать при помощи данного теста единичные виды, это специфичное определение можно выполнить применяя набор GenoType Mycobacterium AS (см. Таблица интерпретации).

Принцип тестирования

Тест GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 основан на DNA•STRIP технологии. Процедура проведения теста подразделяется на три этапа: (i) Выделение ДНК из культур (выросших на плотной или жидкой среде; необходимые для этого реагенты в наборе 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 (AM-A и AM-B) 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 достоверно дифференцируют различные последовательности бактериальных видов. 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	299A	29996A
Количество тестов	12	96

Состав Комплекта 1 из 2 (хранить при температуре от 2°C до 8°C)

Мембранные стрипы, покрытые специфическими пробами (Mycobacterium CM 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
Эталон для оценки	1	4
Руководство к пользованию	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 Mycobacterium CM VER 2.0) состоит из буфера, нуклеотидов, Таг полимеразы	120 мкл	4x 240 мкл
Амплификационная Смесь В (AM-B GT Mycobacterium CM VER 2.0) состоит из солей, специфических праймеров, красителя	420 мкл	4x 840 мкл
Внутренний Контроль ДНК (IC GT Mycobacterium CM VER 2.0) содержит бактериальную ДНК	192 мкл	192 мкл
Контроль ДНК (C+ GT Mycobacterium CM VER 2.0) содержит бактериальный контроль ДНК	95 мкл	95 мкл

Хранение 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.

Внутренний Контроль ДНК (IC) должен храниться при температуре от –20°C до –18°C в том же помещении, где выделяют ДНК.

Контроль ДНК (C+) должен храниться при температуре от –20°C до –18°C в том же помещении, где вносят ДНК в пробирки с аликвотированными мастер миксами.

Повторно заморозьте AM-A, AM-B, IC и C+ сразу после использования.

Не допускайте повторных циклов замораживания и оттаивания (>4x) AM-A, AM-B, IC и C+; при обработке небольшого количества образцов за одно тестирование, аликвотируйте AM-A, AM-B, IC и C+.

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. Нужно всегда использовать защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз.

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

Конъюгатный концентрат (**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

- 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 *или* TwinCubator (аппарат для мануальной гибридизации) *или* аппарат для автоматической гибридизации)
- Термоциклер
- Таймер
- Пинцет
- Наборы для выделения ДНК (GenoLyse®, см. главу Информация для заказа) а также необходимое оборудование
- Реагенты для культивирования микобактерий и необходимое для амплификации оборудование
- Реагенты для деконтаминации образца, а так же необходимое оборудование
- Вода (дистиллированная)

Контроль качества

Чтобы убедиться в корректном проведении тестирования и для контроля функционирования реактивов, каждый стрип имеет 3 контрольные зоны:

- Зона Контроля Конъюгата (CC) для проверки связывания конъюгата со стрипом и правильного выполнения хромогенной реакции
- Зона Внутреннего Контроля (IC), которая документирует успешность выделения ДНК и реакции амплификации
- Зона Контроля Рода (GC), которая подтверждает присутствие представителей рода *Mycobacterium*

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, контроли или мембранные стрипы из разных наборов, если их лоты не совпадают (исключения: Ампликоны, полученные на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 можно напрямую гибридизовать со стрипами **GenoType Mycobacterium AS**). Номер партии набора и соответствующие номера партий компонентов набора находятся на этикетках партии, вложенных в комплект.

Этот набор включает один Внутренний Контроль ДНК (IC), который добавляют в каждый образец на этапе экстракции ДНК. Ампликон Внутреннего Контроля ДНК связывается с зоной Внутреннего Контроля на стрипе (см. выше).

Образец отрицательного контроля для выявления случаев возможной контаминации должен стать неотъемлемой частью каждого тестирования и его необходимо включать в каждый комплект образцов на этапе экстракции ДНК. На валидном отрицательном контроле должны быть видны исключительно полоски CC и IC.

Дополнительно во время амплификации в комплект образцов может быть включен положительный контроль, содержащий прилагаемый Контроль ДНК (C+). В Контроле ДНК содержится ДНК *M. kansasii* и на соответственном тест-стрипе появляется полоска, как у *M. kansasii* без Внутреннего Контроля (IC). Предоставленного количества достаточно для 19 образцов положительного контроля.

Во время работы не следует подвергать замене IC и C+, потому что это может вызвать получение ошибочных результатов (см. главу Решение проблем).

Требования к образцу

Микобактерии, выросшие на плотной среде (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook), или на жидкой (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) используются в качестве исходного материала для выделения ДНК. Тест не может быть использован для прямого определения в образцах пациента.

Меры предосторожности при работе с образцами

Культуральные образцы, полученные из образцов пациентов, всегда должны рассматриваться, как инфекционные, и работать с ними следует соответствующим образом (см. [3] или [4]). Всегда использовать защитную одежду и перчатки. Образцы от пациентов из группы риска (инфицированные патогенными микроорганизмами и вирусами, включая гепатит Б 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 культуральными образцами, которые могут содержать микобактерии, следует обращаться, применяя методики Biosafety Level 2 или, если это указано, методики Biosafety Level 3 (например, см. [3]). Необходимо соблюдать все принятые на федеральном, региональном (на уровне штата) и местном уровне законы по безопасности труда.

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

Хранение, транспортировка и подготовка

Транспортировка, хранение и подготовка образцов пациентов и культуральных образцов должны осуществляться в соответствии с местными, национальными и/или международными правилами и стандартами, действующими в лаборатории.

Выделение ДНК

Микобактерии выросшие на плотной среде (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook), или на жидкой (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) используются в качестве исходного материала для выделения ДНК. Рабочая площадь должна быть чистой от контаминирующей ДНК.

Для выделения ДНК, набор **GenoLyse**® (см. главу Информация для заказа).

Метод, упомянутый здесь, можно использовать для оценки технических характеристик набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0. Основные характеристики теста не были валидированы на других методах выделения ДНК или на других образцах.

Амплификация

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

Подготовьте для каждого образца:

- 10 мкл AM-A (см. Состав Комплекта 2)
 - 35 мкл AM-B (см. Состав Комплекта 2)
 - 5 мкл раствора ДНК
- Конечный объем: 50 мкл

Определите общее количество образцов (количество анализируемых проб + контрольные образцы). Подготовьте необходимое количество пробирок. Подготовьте мастер-микс, содержащий AM-A и AM-B и аккуратно, но тщательно перемешайте (не на вортексе). Как альтернатива, содержимое реакционной пробирки AM-A можно полностью перенести в реакционную пробирку AM-B. 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 свеж- приготовленным каждый раз и его следует сразу использовать. Аликвотируйте по 45 мкл мастер-микса в каждую подготовленную ПЦР-пробирку. В отдельном помещении внесите в каждую аликвоту по 5 мкл раствора ДНК (или C+ для положительного контроля). Повторно заморозьте AM-A, AM-B и C+ сразу после использования.

Программа амплификации:

При использовании термоциклера от Hain Lifescience с соответствующими предустановками, выберите протокол "MDR CUL".

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

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 HYB 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.

1. **Внесите по 20 мкл Денатурирующего Раствора (DEN, голубого цвета) в угол каждой ячейки.**
2. **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!
3. **Осторожно добавьте в каждую ячейку по 1 мл предварительно нагретого Гибридизационного Буфера (HYB, зеленого цвета). Аккуратно покачивайте ванночку до получения гомогенного окрашивания.**
Следите, чтобы раствор не попал в соседние ячейки.
4. **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.
5. **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.
6. **Полностью аспирируйте Гибридизационный Буфер.**
К примеру, можно использовать пастеровскую пипетку, соединенную с вакуумным насосом.
7. **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.**
8. **Далее работайте при комнатной температуре. Полностью удалите раствор для Жесткой Промывки.**
Слейте моющий раствор в контейнер для отходов, а остатки жидкости удалите похлопыванием ванночки по фильтровальной бумаге. Таким же образом поступайте и при следующих этапах отмывки.
9. **Отмойте каждый стрип в 1 мл Промывающего Раствора (RIN) в течение 1 мин на платформе шейкера/TwinCubator (слейте RIN после инкубации).**
10. **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 четко 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 четко 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 IC должны совпадать с соответствующими линиями на эталоне. Отметьте положительные сигналы в предпоследней колонке, определите вид при помощи таблицы интерпретации и запишите название вида в последней колонке. Поставляемый шаблон так же предназначен для оценки результатов и должен совпадать с полосками стрипов СС и IC. На каждом стрипе всего 17 зон реакции (см. рис.).



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.

Внутренний Контроль (IC)

Если тест выполнен правильно, контроль ампликонов, свяжется с Зоной Внутреннего Контроля на стрипе.

В случае положительного результата тестирования, сигнал в зоне Внутреннего Контроля 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. Пожалуйста, обратите внимание, на то, что положительный контроль С+ не проявляет полоску IC.

Если развились только полоски СС и IC, это значит, что отрицательный результат верен. Отсутствие полоски IC в случае отрицательного результата, свидетельствует об ошибке на этапе выделения ДНК и/или по ходу реакции амплификации, или указывает на присутствие ингибиторов амплификации. В этом случае результаты тестирования недействительны и необходимо повторное тестирование соответствующего образца.

Контроль Рода (GC)

Окрашивание этой зоны документирует присутствие представителя рода *Mycobacterium*. Интенсивность этой полоски варьирует в зависимости от вида микобактерии.

Когда видо-специфичная полоска шаблона развилась, полоска GC может быть очень слабой или даже совсем отсутствовать из-за конкуренции во время одной реакции амплификации. Тем не менее, результат теста считается действительным.

Другие полоски

Специфические пробы, для оценки смотрите в таблице интерпретации.

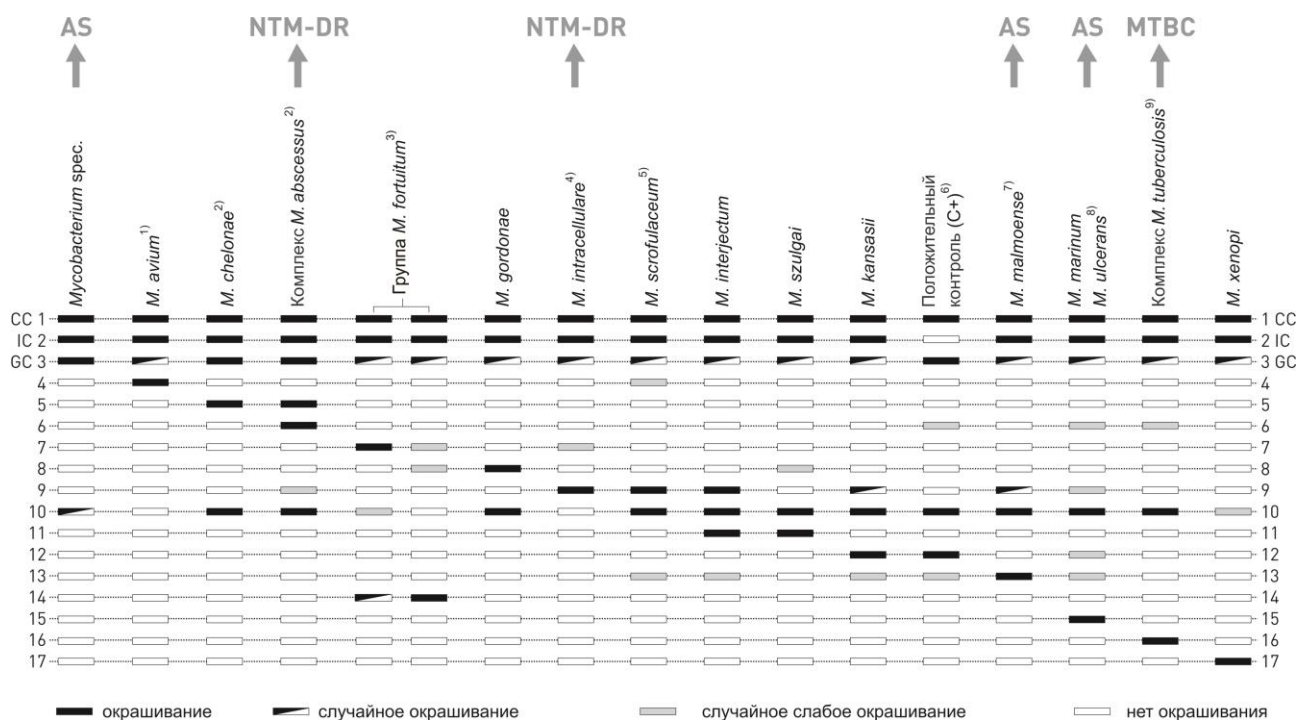
Пожалуйста, обратите внимание:

Не все полоски на стрипе могут показывать одинаковую силу сигнала. Только полоски с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Внутреннего Контроля (IC), могут приниматься во внимание (исключения: смотрите главу Таблица интерпретации).

Некоторые дополнительные виды микобактерий можно идентифицировать при помощи набора **GenoType Mycobacterium AS** (см. Таблица интерпретации).

Ампликоны, полученные на наборе **GenoType Mycobacterium CM VER 2.0** можно напрямую гибридизовать со стрипами **GenoType Mycobacterium AS**.

Таблица интерпретации



Полоска №1 (CC): Контроль Конъюгата
Полоска №2 (IC): Внутренний Контроль
Полоска №3 (GC): Контроль Рода

AS: GenoType Mycobacterium AS

MTBC: GenoType MTBC

NTM-DR: GenoType NTM-DR

1) Не включает другие виды комплекса *M. avium*.

2) *M. immunogenum* проявляет такие же линии, как и *M. chelonae* или комплекса *M. abscessus*.

Представители комплекса *M. abscessus* могут быть дифференцированы на наборе GenoType NTM-DR.

3) В группе *M. fortuitum* только перечисленные далее виды были протестированы: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. alvei* и *M. septicum*. Так же не было протестировано, проявляют ли другие представители группы *M. fortuitum* такой же шаблон полосок.

M. fortuitum проявляет линии как изображено в колонке слева.

В большинстве случаев, *M. peregrinum* проявляет линии как изображено в колонке справа. В редких случаях, однако, *M. peregrinum* может показывать линии как изображено в колонке слева.

M. alvei и *M. septicum* проявляют линии как изображено в колонке справа.

Виды, не относящиеся к группе *M. fortuitum*:

M. mageritense проявляет линии как изображено в колонке слева без полоски 14.

Редкие варианты *M. smegmatis* так же могут проявлять полоски как изображено в колонке слева без полоски 14. Тем не менее, в этом случае полоска 7 проявляет только слабый сигнал.

4) *M. marseillense* и *M. chimaera* (оба вида относятся к комплексу *M. avium*) проявляют такие же полоски, как *M. intracellulare*.

M. intracellulare и *M. chimaera* могут быть дифференцированы на наборе GenoType NTM-DR.

5) *M. paraffinicum* и *M. parascrofulaceum* показывают такие же полоски, как *M. scrofulaceum*.

6) Положительный контроль (C+) показывает полосу, характерную для *M. kansasii* без полоски Внутреннего Контроля (IC).

7) *M. haemophilum*, *M. palustre* и *M. nebraskense* показывают такие же полоски, как *M. malmoeense*.

M. haemophilum/*M. nebraskense* можно идентифицировать на наборе GenoType Mycobacterium AS.

8) *M. ulcerans* можно идентифицировать на наборе GenoType Mycobacterium AS.

9) Представители комплекса *M. tuberculosis* могут быть дифференцированы на наборе GenoType MTBC.

Важные замечания для оценки результатов

M. chelonae и комплекс *M. abscessus* не может быть дифференцирован, если ампликоны, гибридованные и к линии Контроль Рода (GC) и к полоске 6 супрессируются посредством конкуренции единичных реакции на этапе амплификации. Поэтому развитие полоски GC требуется для идентификации *M. chelonae* и комплекса *M. abscessus*.

M. scrofulaceum и *M. malmoeense* дифференцированы только по значениям интенсивности полоски 13, при развитии специфических полосок 9, 10 и 13. Если интенсивность полоски 13 слабее, чем интенсивность полоски Внутреннего Контроля (IC), это указывает на присутствие *M. scrofulaceum*. Если же интенсивность полоски 13 равносильна или более выражена, чем интенсивность полоски Внутреннего Контроля (IC), это указывает на присутствие *M. malmoeense*.

Для *M. szulgai*, интенсивность полоски 11 может быть слабее, чем полоска IC.

Для комплекса *M. tuberculosis*, интенсивность полоски 10 и/или 16 может быть слабее, чем полоска IC.

Если полоска 15 тоже положительно окрасилась, необходимо применить дополнительные методы детекции.

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. Результаты тестирования должны интерпретироваться совместно с результатами других лабораторных исследований и клинических данных, доступных для лечащего врача.

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

Данным методом нельзя дифференцировать виды, входящие в комплекс *M. tuberculosis*. Так же и члены комплекса *M. abscessus* не могут быть идентифицированы.

Если больше, чем один вид выявляется по полоскам шаблона, то эти виды нельзя различить данной тест-системой.

В случае, если бактериальный штамм не принадлежит ни к одному из видов, идентифицируемых набором **GenoType Mycobacterium CM**, но тесно связан с ними, то крайне редко они могут вызывать окрашивание полосок шаблона близких видов, улавливаемых этой тест-системой.

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

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 этого исследования была выполнена с использованием набора **GenoLyse®**, предназначенного для экстракции ДНК из культурального материала. Основные характеристики теста не были валидированы на других методах выделения ДНК или на других образцах.

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 CC и IC. 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.
- Ошибка на этапе выделения ДНК. Повторите выделение.
- IC и C+ заменены. В этом случае отрицательный контроль и отрицательные образцы показывают полоску *M. kansasii* без полоски IC, а положительный контроль (если включён) не показывает полоску *M. kansasii*, а только полоски CC и IC. Полоска положительных образцов, в основном, не интерпретируема. Повторите выделение.

Информация для заказа

Номер для заказа

GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 (набор для анализа 12 образцов)	299A
GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 (набор для анализа 96 образцов)	29996A
GenoLyse® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 12 образцов)	51612
GenoLyse® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 96 образцов)	51610
GenoType Mycobacterium AS (набор для анализа 12 образцов)	298
GenoType Mycobacterium AS (набор для анализа 96 образцов)	29896
GenoType MTBC (набор для анализа 12 образцов)	301
GenoType MTBC (набор для анализа 96 образцов)	30196
GenoType NTM-DR (набор для анализа 12 образцов)	29712
GenoType NTM-DR (набор для анализа 96 образцов)	29796

Технические характеристики

Для оценки технических характеристик набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 тестирование проводили, как описано в инструкции по использованию.

Диагностическая характеристика

Диагностические технические характеристики набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 были определены на 114 культивированных образцах. Набор **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 сравнивали с культурой (успешное культивирование на плотной среде Loewenstein-Jensen или в MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) и последующей идентификацией видов на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0). Экстракцию ДНК выполняли на наборе **GenoLyse®** в соответствии с инструкцией для использования.

Результаты тестирования декларировались, как истинно положительные, если результаты, полученные на **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 совпадали с результатами культуры/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0.

Таблица 1: Технические характеристики набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 для выявления микобактерий из культурального материала сравнивали с культурой/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Myco CM V1)

GenoType Mycobacterium CM VER 2.0	Культура/GT Myco CM V1		Диагностическая чувствительность : 100% Диагностическая специфичность :100% Предективное положительное значение : 100% Предективное отрицательное значение : 100%
	положительный	отрицательный	
	105 ¹⁾	0	
	0	9	

¹⁾ 105 образцов были идентифицированы как 7х комплекс *M. abscessus*, 15х *M. avium*, 6х группа *M. fortuitum* (*M. fortuitum*), 8х *M. goodnae*, 16х *M. intracellulare*, 6х *M. kansasii*, 6х *M. malmoense*, 5х *M. marinum*/*M. ulcerans*, 2х *M. scrofulaceum*, 1х комплекс *M. tuberculosis*, 5х *M. xenopi*, 5х *M. chelonae* и 23х *Mycobacterium* спец.

Аналитические характеристики

Аналитическая специфичность

Специфичность набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 обеспечивается благодаря четкой разработке специфических праймеров и зондов, которые в частности считаются, гомологичными при сравнении последовательностей, опубликованных в генетической базе данных, и подвергаются жестким условиям реакции.

Аналитическая специфичность набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 была определена на всех штаммах микобактерий, идентифицируемых этим тестом, а так же на штаммах микобактериальных и не-микобактериальных видов, которые не улавливаются этой тест-системой.

Все микобактерии, идентифицируемые этим исследованием, генерировали корректные специфические полосы. Изоляты видов микобактерий, не идентифицируемые тест-системой и все протестированные не-микобактериальные виды не отображали специфических полос. Таким образом, аналитическая специфичность для специфичных проб на стрипах **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 оказалась 100%.

Те же образцы были так же оценены на Родо-специфичные пробы - Genus-specific probe (GC). В этих пробах выявленная аналитическая специфичность составила 98.6%.

Штаммы всех микобактерий, идентифицируемых набором **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 были протестированы:

<i>M. avium</i>	<i>M. szulgai</i>	Комплекс <i>M. abscessus</i>	Комплекс <i>M. tuberculosis</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. kansasii</i>	(<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ,	(<i>M. tuberculosis</i> ,
<i>M. immunogenum</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> ,	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i> ,
<i>M. mageritense</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>)	<i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i> ,
<i>M. goodnae</i>	<i>M. marseillense</i>		<i>M. bovis</i> BCG,
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. palustre</i>	Группа <i>M. fortuitum</i>	<i>M. africanum</i> ,
<i>M. chimaera</i>	<i>M. nebraskense</i>	(<i>M. fortuitum</i> ,	<i>M. microti</i> ,
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. peregrinum</i> ,	<i>M. canettii</i> ,
<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. alvei</i> ,	<i>M. pinnipedii</i>)
<i>M. paraffinicum</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. septicum</i>)	
<i>M. interjectum</i>			

Протестированные виды микобактерий, не выявляемые на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0:

<i>M. asiaticum</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. heckeshornense</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. gastris</i>	<i>M. intermedium</i>	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. triple</i>)
<i>M. genavense</i>	<i>M. lentiflavum</i>		

Протестированные не-микобактериальные виды, не выявляемые на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0:

<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	<i>Nocardia amarae</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Streptomyces somaliensis</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>Tsukamurella inchonensis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Nocardia farcinica</i>	<i>Rhodococcus ruber</i>	<i>Tsukamurella paurometabola</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Nocardia otidiscaviarum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Tsukamurella pulmonis</i>)

Аналитическая чувствительность (Предел детекции. LOD)

Для определения аналитической чувствительности набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 для культурального материала, четыре разведения культуры BCG (1,65x 10⁶, 1,65x 10⁵, 1,65x 10⁴ и 1,65x 10³ КОЕ/мл) были поставлены в трёх повторностях. Включая отрицательный контроль, ДНК выделяли с использованием набора **GenoLyse®** и анализировали на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0, соблюдая протокол ПЦР "MDR CUL". Предел выявления составил 1,65x 10⁵ КОЕ/мл.

Воспроизводимость

Точность интра-анализа и точность интер-анализа была определена на следующих четырёх образцах:

- Разведения культуры BCG выше предела детекции
- Разведения культуры BCG на пределе детекции
- Образцы, положительные на содержание ДНК *Bordetella pertussis*
- Отрицательный контроль

Экстракцию ДНК проводили с использованием набора **GenoLyse®**, а изоляты тестировали на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 следуя протоколу ПЦР “MDR CUL”.

Чтобы определить точность интра-анализа, образцы были проверены в четырёх параллелях при идентичных условиях (та же серия наборов, тот же аппарат, тот же оператор, то же время отсчёта и т.д.) за один прогон ПЦР. Во всех параллелях продемонстрированы идентичные и правильные результаты и сравнимая интенсивность сигнала. Таким образом, достигнутая точность интра-анализа составила 100%.

Чтобы определить точность интер-анализа, образцы были протестированы в течение трёх разных дней. Другие условия эксперимента (серия набора, аппарат, оператор и т.д.) были идентичными. Во всех параллелях показаны идентичные и правильные результаты и сравнимые интенсивности сигнала. Таким образом, достигнутая точность интер-анализа составила 100%.

Интерферирующие вещества

Есть вещества, которые могут ингибировать ПЦР реакции. Такие ингибиторы, к примеру, могут попасть из культуральной среды. Для того чтобы определиться, не влияет ли среда на **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0, шесть разных штаммов комплекса *M. tuberculosis* были культивированы на четырёх разных средах (плотных средах: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, и Middlebrook-7H10, жидкая среда: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)), ДНК была экстрагирована на наборе **GenoLyse®**, а изоляты были протестированы на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 с применением ПЦР протокола “MDR CUL”.

Все образцы продемонстрировали правильные результаты на всех проверенных средах. Таким образом, можно исключить, что из проверенных сред попадают ингибиторы при тестировании на **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0.

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 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2020.
2. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 177-215.
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).

Важные изменения в инструкции IFU-299A-03

Глава	Изменения
Реагенты и инструменты	Прежние разделы «Состав набора», «Хранение и утилизация компонентов набора», «Меры предосторожности при работе с компонентами набора» и «Необходимые, но не поставляемые материалы» теперь являются подразделами раздела «Реагенты и инструменты».
Меры предосторожности при работе с компонентами набора	Для получения дополнительной информации об опасных веществах в составе комплекта, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта: www.hain-lifescience.com/products/msds.html
Требования к образцу	Глава «Требования к образцу» была переименована (Это изменение касается только следующих инструкций по использованию на иностранном языке: английском). Новое: «Со всеми культуральными образцами, которые могут содержать микобактерии, следует обращаться, применяя методики Biosafety Level 2 или, если это указано, методики Biosafety Level 3 (например, см. [3]). Необходимо соблюдать все принятые на федеральном, региональном (на уровне штата) и местном уровне законы по безопасности труда.» Новое: «Транспортировка, хранение и подготовка образцов пациентов и культуральных образцов должны осуществляться в соответствии с местными, национальными и/или международными правилами и стандартами, действующими в лаборатории.»

HAIN

LIFESCIENCE

299A-03-08

CE

IVD



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany

www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0