

Министерство здравоохранения Республики Казахстан

Национальный центр проблем туберкулеза МЗ РК

Согласовано

Заместитель директора Департамента
науки и человеческих ресурсов МЗ РК

«Утверждаю»

Директор Департамента науки и
человеческих ресурсов МЗ РК

 **А. Оспанова**

« » _____ 2013 г.
31 декабря



« » _____ 2013 г.
31 декабря

Структура и алгоритмы

**новейших молекулярно-генетических технологий экспресс диагностики туберкулеза
и лекарственной устойчивости в Республике Казахстан**

Методические рекомендации

Алматы 2013

УДК: 616.24

ББК 55.4

Рецензенты:

Ракишева А.С. Зав. кафедрой фтизиопульмонологии Каз. НМУ им.

С.Д.Асфендиярова, д.м.н., профессор

Исмаилов Ш.Ш. Менеджер проекта Глобального фонда в РК для борьбы со СПИДом, туберкулёзом и малярией по компоненту «Туберкулёз», д.м.н., профессор.

Абдукаримов Х.Х. Зав отделом анестезиологии и реанимации НЦПТ, д.м.н.

Авторы:

Аленова А.Х. г. н. с. НЦПТ МЗРК д.м.н., профессор

Абилдаев Т.Ш. директор НЦПТ МЗРК д.м.н., профессор

Жумадилов Ж.Ш. Генеральный директор ЧУ «Центр наук о жизни» АОО «Назарбаев Университет», д.м.н., профессор

Берикова Э.А. Зам. директора по научной работе НЦПТ МЗРК, к.м.н.

Терликбаева А.М. Генеральный менеджер Центра изучения глобального здоровья в Центральной Азии, MSc

Берикханова К.Е. Ученый секретарь ЧУ «Центр наук о жизни» АОО «Назарбаев Университет», к.м.н.

Бисмилда В.Л. Зав. референс лаборатории НЦПТ МЗРК, к.б.н.

Чингисова Л.Т. врач референс лаборатории НЦПТ МЗРК, к.м.н.

Даришева М.А. Менеджер проекта Центра изучения глобального здоровья в Центральной Азии, к.м.н

Структура и алгоритмы новейших молекулярно-генетических технологий экспресс диагностики туберкулеза и лекарственной устойчивости в Республике Казахстан: Методические рекомендации /А.Х.Аленова, Т.Ш.Абилдаев, Ж.Ш.Жумадилов и др.- Алматы, 2013.

ISBN 978-601-7408-80-0

В разработанных методических рекомендациях представлены новейшие данные по молекулярно-генетическим экспресс методам выявления МЛУ и ШЛУ ТБ, дифференциации туберкулезных штаммов от атипичных – микобактериозов. Детальная информация по этапам подготовки и постановки реакций в зависимости от полученного материала, интерпретации результатов в соответствии с рекомендациями ВОЗ и надлежащей лабораторной практикой (GLP), позволят на основе единых подходов к методике проведения тестов, а также критериев оценки, качественно осуществлять экспресс диагностику различных типов резистентности в противотуберкулезных учреждениях Республики Казахстан. Методические рекомендации предназначены для широкого круга специалистов противотуберкулезных учреждений, координаторов по бактериологической диагностике, врачей бактериологов.

УДК: 616.24

ББК 55.4

ISBN 978-601-7408-80-0

Содержание

1. Основные термины и сокращения	4
2. Введение	7
3. Основная часть	9
3.1. Общее представление об экспресс методах диагностики МЛУ ТБ и ШЛУ ТБ	9
3.2. GenoType® MTBDRplus - (V1.0 и 2.0)	15
3.2.1. Приготовление образцов	15
3.2.2. Выделение ДНК	18
3.2.3. Приготовление «мастер микс»	23
3.2.4. Амплификация и гибридизация (2 этап)	28
3.2.5. Интерпретация результатов	40
3.3. GenoType®Mycobacterium CM	51
3.4. GenoType® MTBDRsl	65
3.5. GeneXpertMTB/RIF	81
Заключение	87
Приложение 1. Требования к помещениям для проведения молекулярно-генетических исследований	88
Литература	97

1. Основные термины и сокращения

Am	Амикацин
A-NB	Буфер нейтрализации
A-LYS	Буфер для лизиса
Biohazard	Одноразовые коробки для отходов
BSL-2-	Лаборатория с биозащитой 2 уровня
C	Цитозин
CA	Контроль амплификации
Cm	Капреомицин
CC	Контроль конъюгата
CON-C	Концентрат конъюгата
CON-D	Растворитель конъюгата
DEN	Раствора денатурации
DNA-STRIP®	ДНК-стрип
FIND	Фонд инновационных методов диагностики
GeneXpert/RIF	Автоматизированный диагностический тест, который может определить микобактерии туберкулеза (МТБ) и устойчивость к рифампицину
GenoLyse	Набор для выделения бактериальной ДНК
GenoType® MTBC	Дифференциация внутри комплекса <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
GenoType® MTBDRplus	Идентификация комплекса М. Tuberculosis и его резистентности к рифампицину и/или изониазиду
GenoType® MTBDRplus 2.0	Идентификация комплекса М. Tuberculosis и его резистентности к рифампицину и/или изониазиду 2 версия
GenoType® MTBDRsl	Идентификация комплекса М. Tuberculosis и его резистентности к фторхинолонам, аминогликозидам/циклическим пептидам и этамбутолу.

GenoType®Mycobacterium CM-	Идентификация комплекса M. tuberculosis и 30 наиболее часто встречающихся видов микобактерий в культуре.
GLP	Надлежащая лабораторная практика
GLI	Глобальная лабораторная инициатива
G	Гуанин
H	Изониазид
HotStarTaq polymerase	Taq-полимераза
HYB	Буфер для гибридизации
inhA	Ген, кодирующий выработку эноил редуктазы
Km	Канамицин
katG	Ген, кодирующий выработку каталазы
M.tuberculosis	Микобактерии туберкулеза
Minispin	Миницентрифуга
mM	Молярная единица измерения концентрации растворов
Min	Минута
NALC	N-ацетил-цистеин
PCR Hood	Настольный ламинарный минибокс
PNM	Праймер-нуклеотидная смесь
Rif	Рифампицин
R	Устойчивость
RIN	Раствор для промывки
Rpoβ	Ген, кодирующий РНК полимеразу
S	Чувствительность
Sec	Секунда
STR	Раствор для жесткой промывки
SUB-C	Концентрат субстрата
SUB-D	Растворитель субстрата
TUB контроль	Туберкулезный контроль
Twincubator	Термошейкер для гибридизации
V	Версия
CM(common mycobacteria)	Общие микобактерии
ml	Миллилитры
μl	Микролитры

UC	Универсальный контроль
GC	Контроль рода
БШБ-2	Шкаф биологической безопасности 2
ВОЗ	уровня
	Всемирная Организация
	здравоохранения
МБТ	Микобактерии туберкулеза
	Множественная лекарственная
МЛУ	устойчивость
СОП	Стандартная операционная процедура
ШЛУ	Широкая лекарственная устойчивость

2. Введение

В течение последнего десятилетия на развитии новых диагностических методов мультирезистентного туберкулеза (МЛУ ТБ) было сконцентрировано беспрецедентное внимание и проведены исследования на небывалом ранее высоком уровне.

Разработан глобальный план «Остановить Туберкулез» (Стоп ТБ) до 2015 года по развитию новых методов диагностики, и очерчены мероприятия, направленные на доступность этих методов для регионов с высоким уровнем бремени туберкулеза [1].

Группой «Новые Методы Диагностики» Партнерства Стоп ТБ, Фондом Инновационных Методов Диагностики (FIND), Глобальной Лабораторной Инициативы (GLI), Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ), Компанией «Hain Lifescience GmbH» и неправительственными агентствами разработано 11 новых методов диагностики ТБ и МЛУ ТБ [2,3].

Все эти методы поэтапно и успешно внедряются последние 3 года в Национальном центре проблем туберкулеза и во всех противотуберкулезных диспансерах Республики Казахстан, что существенно отражается на своевременности выявления больных туберкулезом, их изоляции, адекватности и эффективности лечения.

В конечном итоге, оздоровление окружающей среды отразилось на позитивной динамике эпидемиологических показателей в стране, подтвердив тезис о том, что туберкулез является управляемой инфекцией.

В настоящее время набор диагностических методов, используемых бактериологическими лабораториями нашей страны, значительно расширился. В первую очередь это произошло за счет внедрения в практику различных методов исследования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ), позволяющих проводить как фенотипическую, так и генотипическую идентификацию МБТ.

В основе предлагаемых экспресс методов лежит полимеразная цепная реакция, она применяется для быстрого диагностирования туберкулеза в клинических материалах, а также для детекции устойчивости к препаратам I и II ряда путем определения

соответствующих мутаций в геноме микобактерий. Кроме того, данный тест позволяет идентифицировать МТБ комплекс, а отдельный вид теста - различать микобактерии внутри комплекса. Проведение теста относительно несложное, включает в себя три стадии - экстракцию ДНК, амплификацию и гибридизацию. Результат может быть получен в течение 2-х суток.

Генотипические методы, основанные на выявлении мутаций в генах МБТ, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, только начинают внедряться, и еще не все лаборатории знакомы с возможными преимуществами и недостатками.

Учитывая то, что наиболее важным инструментом в улучшении эпидемиологической ситуации по туберкулезу является качественная бактериологическая диагностика заболевания, в разработанных методических рекомендациях представлены новейшие данные по молекулярно-генетическим экспресс методам выявления резистентности к основным противотуберкулезным препаратам, детальная информация по этапам подготовки и постановки реакций в зависимости от полученного материала, интерпретация результатов в соответствии с рекомендациями ВОЗ, надлежащей лабораторной практикой (GLP) [4].

3. Основная часть

3.1. Общее представление об экспресс методах диагностики МЛУ ТБ и ШЛУ ТБ

В разработанных методических рекомендациях представлены новейшие данные по молекулярно-генетическим экспресс методам выявления резистентности к основным противотуберкулезным препаратам изониазиду и рифампицину, позволяющим в течение 2-х суток выявить мультирезистентный туберкулез (GenoType® MTBDRplus, GenoType® MTBDRplus 2.0 с МБТ-) и туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью (GenoType® MTBDRsl и отдифференцировать туберкулезные штаммы от атипичных – микобактериозов (GenoType®Mycobacterium CM). Микобактериозы могут клинически имитировать мультирезистентный туберкулез, особенно при внелегочных формах, поэтому доказательная база, основанная на достоверных высокотехнологических методах чрезвычайно важна.

Новые возможности открылись с внедрением метода GeneXpert/RIF

- GeneXpert, автоматизированный молекулярно-диагностический метод, проводимый в реальном времени обнаруживает МЛУТБ в образцах мокроты с МБТ+ и в большинстве образцов, у больных с МБТ- за 2 часа.
- GeneXpert позволяет установить ТБ и МЛУ менее чем за сутки, а классическое обследование - не менее 75 дней.
- GeneXpert позволяет на 30% увеличить выявляемость новых случаев туберкулеза
- Молекулярно-генетические методы обладают доказанной высокой чувствительностью и существенно снижают сроки получения результатов диагностики ТБ и МЛУ, что обеспечивает своевременность/эффективность лечения) и инфекционный контроль.

GenoType® MTBDRplus (Хайн тест)

Тест основан на мультиплексной ПЦР в комбинации с обратной гибридизацией с мембранными полосками, покрытыми специфичными к цели олигонуклеотидами.

Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к рифампицину и/или изониазиду в мокроте с положительным мазком.

Чувствительность и специфичность GenoType®MTBDR 99% и 100% при оценке резистентности по сравнению с ТЛЧ (D.Hillemann et all, 2005г)

Проект FIND /SAMRC/ NHLS в Южной Африке - чувствительность и специфичность GenoType®MTBDR 97% и 98%.

Метод предназначен для обследования впервые выявленных больных туберкулезом с МБТ +. Результат через 2 дня.

GenoType®MTBDRplus выявляет устойчивость МБТ к *изониазиду* и *рифампицину*, которая связана с наличием мутаций в участках **генов:**

- *rpoB*, кодирующего РНК полимеразы, при мутациях она не связывается с *Rif* и тем самым не действует на МБТ;
- *katG*, кодирующего выработку каталазы/пероксидазы и определяющего высокий уровень резистентности к *H*;
- *inhA*, кодирующего выработку эноил редуктазы и определяющего низкий уровень резистентности к *H*.

Почему ген – *rpoB*?

- в норме при чувствительных штаммах МБТ рифампицин связывает полимеразу РНК и тем самым прекращается жизненный цикл МБТ,
- ген - *rpoB* кодирует РНК полимеразу,

- мутации в гене - groV ведут к образованию мутантной полимеразы РНК, которую рифампицин уже не связывает,
- МБТ с мутациями в гене - groV резистентны к рифампицину.

Существуют следующие виды тестов «Хайна»:

1. **GenoType® MTBDRplus (V1)** – Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к рифампицину и/или изониазиду в мокроте с положительным мазком и культуре.
2. **GenoType® MTBDRplus (V2)** – Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к рифампицину и/или изониазиду в мокроте с положительным и отрицательным мазком. Материал должен быть обработан NaOH-NALC.
3. **GenoType® MTBDRsl** – Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к фторхинолонам, аминогликозидам, циклическим пептидам и этамбутолу.
4. **GenoType® Mycobacterium CM** - Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и 30 наиболее часто встречающихся видов микобактерий в культуре.
5. **GenoType® MTBC** – Дифференциация внутри комплекса *Mycobacterium tuberculosis*

ЭТАПЫ GenoType®MTBDRplus

- **Выделение ДНК** из проб (жидкой/плотной, клинических образцов)
- **Мультиплексная амплификация** с биотин-мечеными праймерами, программа амплификации, количество ее циклов при работе непосредственно с образцами мокроты удлиняется
- **Гибридизация:**
 - химическая денатурация продуктов амплификации;
 - одноцепочечных ампликонов, меченных биотином на мембраносвязочных зондах,
 - отмывка
 - добавление стрептовидин – щелочной фосфатазы, окрашивание.

Оценка теста

- СС- контроль конъюгата,
- АС - контроля амплификации, что означает отсутствие ошибки выделения ДНК или воздействия ингибиторов (например, кровь).
- ТУВ контроль. Если полоска отрицательная, то выделенная ДНК не принадлежит к комплексу *M. Tuberculosis*.

Если все пробы дикого типа одного гена показывают + сигнал, значит, нет мутаций.

1. В случае мутации ампликоны не могут связаться с соответствующими пробами диких типов;
2. Отсутствие сигнала хотя бы в одной пробе дикого штамма указывает на устойчивость.
3. Полоски, появившиеся в зонах:
 - *rpoB* свидетельствуют о резистентности МБТ к **Rif**;
 - *katG* (высокой),
 - *inhA* (низкой) устойчивости к **H**.

GenoType® MTBDRplus - (V2.0)

- Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к рифампицину и/или изониазиду в образцах с положительным и отрицательным мазком (в том числе у детей, больных внелегочными формами).
- Прямой материал: мокрота, бронхоальвеолярный смыв, плевральная и спинномозговая жидкость от больных легочным и внелегочным формами туберкулеза.
- Существенно увеличена чувствительность метода в диагностике МЛУ ТБ
- Рекомендуют для:
 - скрининга МЛУ ТБ у больных с МБТ -
 - выявления МЛУ при рецидивах и неудачах лечения

- выявления МЛУ у лиц, контактных с больными из мест заключения

GenoType® MTBDRsl

- Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к фторхинолонам, аминогликозидам/циклическим пептидам и этамбутолу
- Высокая чувствительность и специфичность
- Результат через 2 суток

GenoType®Mycobacterium CM

- Тест GenoType®Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) основывается на технологии DNA-STRIP® (ДНК-стрип)
- Позволяет идентифицировать следующие семейства микобактерий: *M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordone*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum* | *M. ulcerans*, комплекс *M. tuberculosis*, *M. xenopi*.

GeneXpertMTB/RIF

Метод создан при финансовой поддержке НИИ здоровья США инновационным фондом «FIND», компанией «Cepheid» и университетом медицины и стоматологии Нью-Джерси США .

Метод позволяет:

- автоматизировать обработку образцов, амплификацию ДНК и мультиплексную детекцию на основе ПЦР
- работать с любыми образцами: мокротой, мочой, спинномозговой и плевральной жидкостями
- одновременно осуществлять скрининг на *M. Tuberculosis* и рифампицин-резистентность, выявить 99,5% всех R-устойчивых штаммов
- присутствие нетуберкулезных МБ не дает ложно+ результатов

- для работы используются одноразовые картриджи, содержащие все необходимые реагенты для проведения ПЦР
- закрытая крышка картриджа исключает контаминацию образцов, поэтому не требуется специальный бокс биологической безопасности
- результаты теста выдаются через 2 часа и предоставляются в графическом, табличном и цифровом форматах;
- результаты каждого модуля отражаются в реальном времени.
- информация о времени, оставшемся до получения результата, выводится на экран.

3.2. GenoType® MTBDRplus - (V1.0 и 2.0)

3.2.1. Приготовление образцов

Подготовка шкафа безопасности (БШБ)

- Деконтаминируйте шкаф безопасности-БШБ свежеприготовленным раствором 1% хлора (20 мин), далее очистите 70% спиртом
- Перед работой покрыть рабочую зону бокса бумажным полотенцем смоченным любым дезинфектантом
- Используйте целлофановые контейнеры, которые можно автоклавировать, а также специальные штативы (во избежание разлива капель патологического материала), там же всегда должен быть свежеприготовленный раствор 1% хлора
- Не блокируйте «гриль»- места вытяжки
- Проводите все «операции» по крайней мере в 12 см от передней решетки на рабочей поверхности
- Разместите все материалы и специальные сорбирующие аэрозоли полотенца на расстоянии 12 см от передней решетки

Этап 1 Версия 1.0 и 2.0 (одинаково)

Подготовка клинического образца.

Клинический образец должен быть деконтаминирован ацетилцистеином (N-acetyl-L-cystein/NaOH).

- Рабочая нагрузка, количество образцов, должны быть эквивалентны однократной центрифужной нагрузке (8-16 образцов в одно и то же время)
- Маркируйте 1,5 мл конические пробирки с завинчивающимися крышками (и пробирку и крышку) для каждого образца
- Используйте полностью оттаявшие замороженные и обработанные клинические осадки
- Встряхивайте на вортексе деконтаминированные образцы в течение 1 минуты

- Работайте только с одним образцом в одно и то же время; не оставляйте открытым контейнер или центрифужные пробирки в шкафу безопасности.

Перенесите 500 мкл деконтаминированного образца в 1,5 мл коническую пробирку с завинчивающейся крышкой. Смените наконечники! [5, 6, 7].

Инфекционный материал: каждый этап должен проходить в шкафу безопасности (БШБ) по крайней мере, в соответствующих условиях не ниже лаборатории 2 уровня (BSL2).

Приготовление изолятов из культур, выращенных на твердой среде:

- Рабочая нагрузка, количество образцов, должны быть эквивалентны однократной центрифужной нагрузке (8-16 образцов одновременно)
- Маркируйте 1,5 мл конические пробирки с завинчивающимися крышками (причем и пробирку и крышку) каждого образца, добавьте 100мкл A-LYS буфера при работе по версии 2.0, и 100 мкл специальной воды для молекулярной биологии, при работе по версии 1.0
- Возьмите с твердых сред половину петли колоний (но достаточное количество) *M. tuberculosis*. Промойте петлю! (желательно использовать одноразовые петли)
- Беря колонии *M. tuberculosis*, не нужно царапать поверхность среды, содержащей яичные компоненты, так этот материал может быть ингибитором ПЦР
- Встряхивайте материал на вортексе в течение 1 минуты, чтобы полностью разрушить колонии и твердые скопления

Приготовление изолятов из жидких сред

- Работайте в наборах, эквивалентных одной центрифужной нагрузке (8-16 образцов одновременно).

- Маркируйте 1,5 мл конические пробирки с завинчивающимися крышками (и пробирку и крышку) для каждого образца
- Встряхивайте жидкое содержимое на вортексе в течение 1 минуты, чтобы полностью разрушить скопления
- Перенесите 1 мл *МБТ* с жидкой среды в 1,5 мл центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой. Смените наконечники!
- Встряхивайте на вортексе в течение 1 минуты, чтобы полностью разрушить скопления [7].

Инфекционный материал: каждый этап должен проходить в шкафу безопасности (БШБ) по крайней мере, в соответствующих условиях не ниже лаборатории 3 уровня (BSL3).

Этап 2

Версия 1.0 и 2.0 (одинаково)

- Центрифугируйте образцы бактерий в течение 15 мин при 10000 об./мин
- Используйте микроцентрифуги с противоаэрозольным жестким ротором (открывайте ротор только в шкафу безопасности)
- Маркируйте крышку пробирки перед удалением супернатанта
- Оставляйте пробирки в штативе в течение 1-2 минут, чтобы избежать распространения аэрозоля при их открытии.
- С помощью 1 мл пипетки с наконечниками и фильтром, тщательно аспирируйте супернатант, не удаляя осадок. Смените наконечники!

Инфекционный материал: Этот этап проходит в шкафу безопасности (БШБ) по крайней мере, в соответствующих условиях не ниже 3 уровня лаборатории (BSL3).



Версия 1.0

К колониям из твердой культуры добавьте 100µl молекулярной воды и встряхивайте на вортесе, чтобы гранулы бактерий растворились

Версия 2.0

К колонии из твердой культуры добавьте 100µl A-LYS и встряхивайте на вортесе, чтобы гранулы бактерий растворились

Рисунок 1. Подготовка различных образцов

3.2.2. Выделение ДНК

Этап 3

Версия 1.0: выделение ДНК

- Протрите пробирки дезинфицирующим средством до их удаления из шкафа безопасности (БШБ);

- Инкубируйте пробирки в нагревательном блоке 20 мин, чтобы убить МБТ и разрушить клеточную стенку;
- Всегда проверяйте температуру перед инкубацией!
- МБТ в виде капель на пробирке, крышке могут оставаться жизнеспособными в тепловых блоках или водяных банях!
- Использование небольшой печи может быть лучшим и безопасным решением;

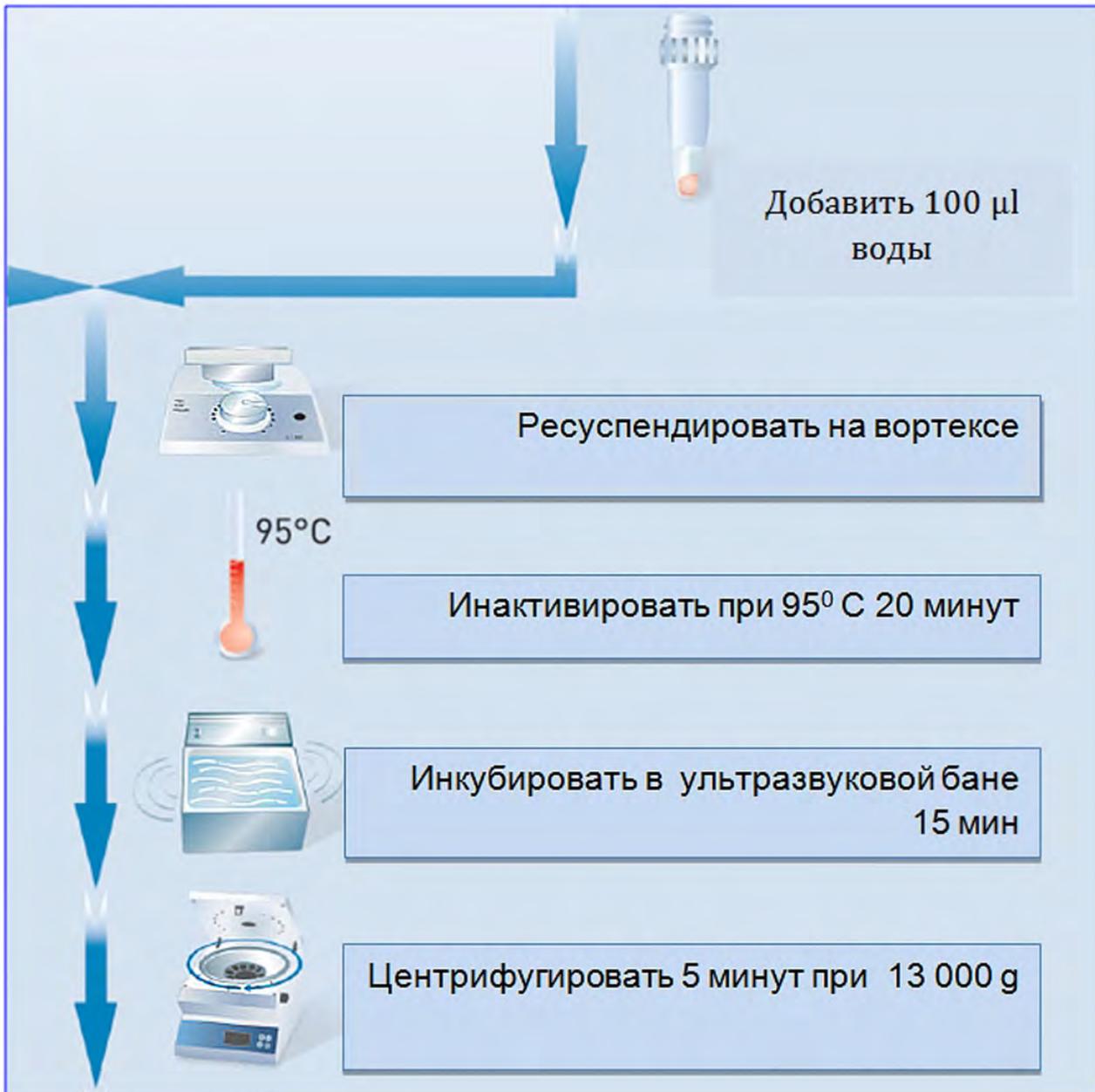


Рисунок 2. Выделение ДНК (версия 1)

- Если процедура была проведена правильно, с этого момента образец можно рассматривать как неинфекционный;
- Заполните ультразвуковую баню отфильтрованной дистиллированной водой;
- Включите ультразвуковую баню в течение 15 минут перед использованием и проверьте эффективность работы куском алюминиевой фольги;
- Поставьте пробирки в плавающий штатив, включите ультразвуковую баню и инкубируйте пробирки в течение 15 мин при комнатной температуре;
- Отмойте ультразвуковую баню водой после каждого использования;
- Очистите ультразвуковую баню 1% свежеприготовленным раствором хлорной извести (20 мин), а затем 70% спиртом;
- Центрифугируйте образцы в течение 5 мин при 13000g (максимальная скорость);
- Используйте миницентрифуги с аэрозолем и жестким ротором (открывать ротор можно только в шкафу безопасности);
- Перенесите супернатант, содержащий ДНК, в 1,5 мл пробирку с завинчивающейся крышкой, с использованием 1 мл пипетки с наконечником с фильтром. Смените наконечники!
- Отсасывайте супернатант осторожно, не поднимая осадок;
- Заморозьте остатки образцов при -20°C ;
- Образцы могут храниться при температуре 4°C не более 7 дней.

Всегда используйте пробирки с завинчивающейся крышкой, чтобы избежать загрязнения



Рисунок 3. Выделение ДНК с GenoLyse (версия 2.0)

- Добавить 100 мкл лизис буфера в осадок и смешайте на вортексе;
- Выдержать в течение 5 минут при 95 ° C, предпочтительно на водяной бане или в нагревательном термоблоке;
- Добавить 100 мкл буфера нейтрализации (A-NB) и смешать содержимое на вортексе;
- Если процедура была проведена правильно, с этого момента образец можно рассматривать как неинфекционный;
- **Инфекционный материал: этот этап должен проходить в шкафу безопасности BSL3 лаборатории.**
- Центрифугируйте образцы в течение 5 мин при 13000g (максимальная скорость);
- Используйте микроцентрифуги с аэрозоль защитной крышкой и жестким ротором (открывать ротор только в шкафу безопасности);
- Перенесите супернатант, содержащий ДНК, в 1,5 мл пробирку с завинчивающейся крышкой, с использованием 1

мл пипетки с наконечником и фильтром. Смените наконечники!

- Осторожно, не поднимайте осадок;
- Заморозьте остатки образцов при -20°C ;
- Образцы могут храниться при температуре 4°C не более 7 дней.

Всегда используйте пробирки с завинчивающейся крышкой, чтобы избежать загрязнения



Рисунок 4. Образец переноса супернатанта, содержащего ДНК

Перенести супернатант, содержащий ДНК, в 1,5 мл пробирку с завинчивающейся крышкой, с использованием 1 мл пипетки с наконечником и фильтром.

Сменить наконечники! Осторожно, не поднимать осадок!

3.2.3. Приготовление «мастер микс»

Добавление ДНК в «мастер микс»

- Работайте в ПЦР настольном ламинарном боксе в ДНК - "грязной зоне" (БШБ2/BSL3).
- Если ДНК была заморожена, подождите пока полностью оттает супернатант
- Пипетировать вверх и вниз
- Добавьте 5 мкл ДНК каждого образца в соответствующие пробирки, содержащие 45мкл «Master Mix»
- Смените наконечники с фильтром перед работой с каждым образцом и далее погрузите их в свежий 1% раствор хлора
- Закройте пробирки ПЦР и поместите их в стерильный химический стакан, покрытый алюминиевой фольгой

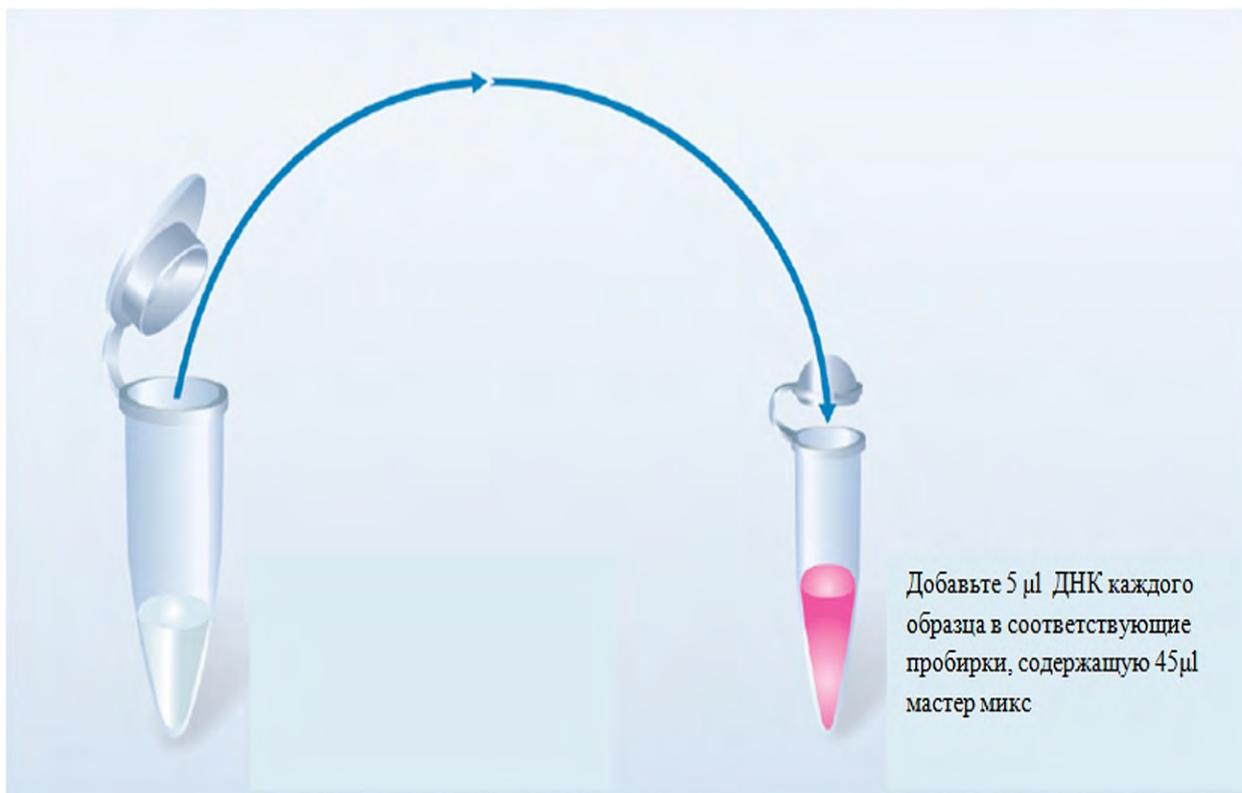


Рисунок 5. Добавление ДНК в «мастер микс»

После окончания процедуры:

- Деконтаминируйте любой материал (флаконы, пробирки и т.п.) перед извлечением из шкафа безопасности и ПЦР бокса
- Обрабатывайте пипетки, штативы, инструменты и сам шкаф безопасности свежеприготовленным 1% раствором хлора (20 мин), а затем 70% спиртом
- Используйте в этой ситуации «спреи» и вышеназванные растворы в стаканах для очистки поверхностей и инструментов.
- Не переносите что-либо из этой зоны в зону подготовки реагентов
- Подготовку образцов проводите в один (отдельный) день, чтобы работа шла однонаправленно.

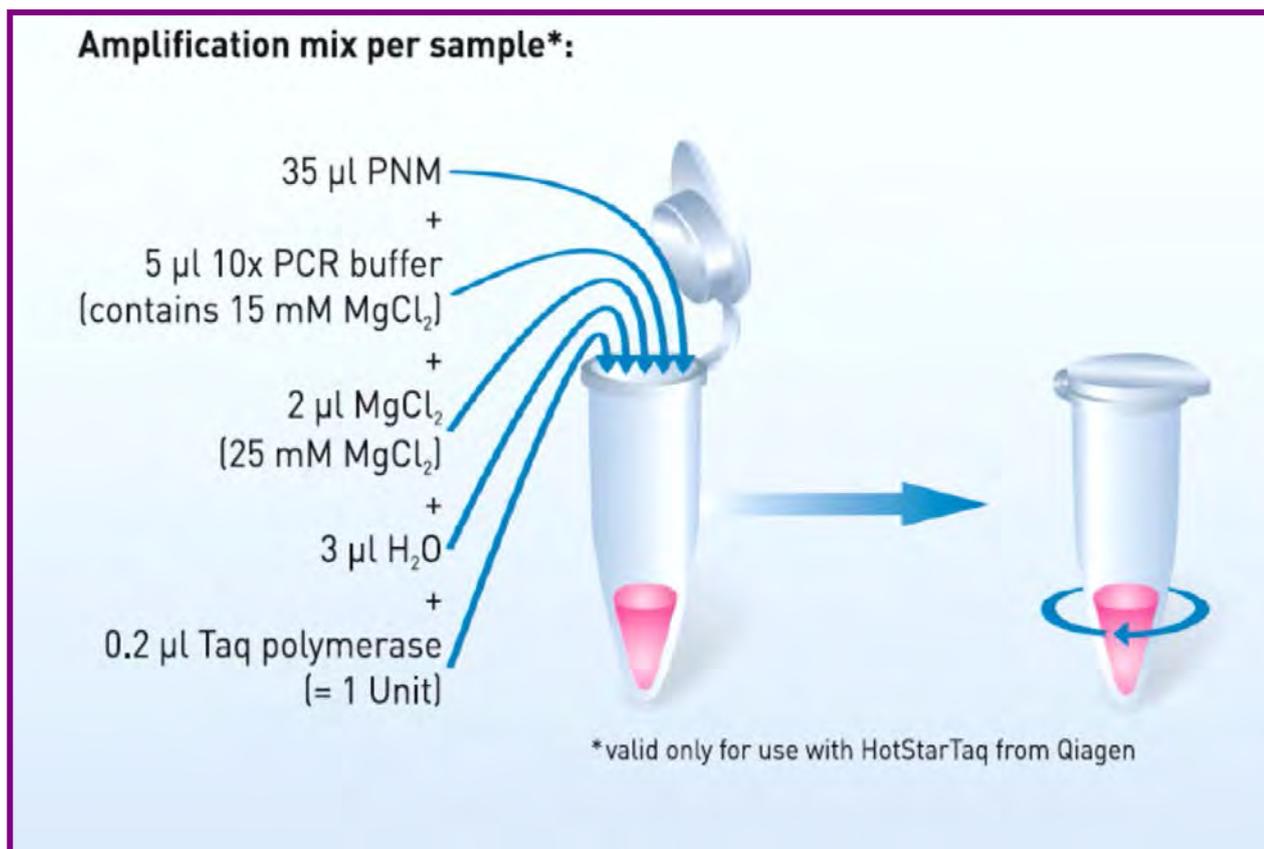
Приготовление «мастер микса»

- Определите количество образцов и контролей
- Используйте это количество плюс 1 для расчета объема различных компонентов «мастер микса»
- Объем «мастер микса» составляет 45мкл в образце
- Наденьте перчатки и халат
- Очистите рабочую зону только что разбавленным 1% раствором хлора (экспозиция 20 мин), а затем 70% спиртом
- Покройте рабочую зону чистыми бумажными полотенцами

Версия 1.0

- Вода для молекулярного исследования и другие реагенты, должны храниться в зоне, свободной от ДНК
- Подождите пока полностью не оттают все реагенты
- Внесите расчетное количество различных компонентов «мастер микса» в 1,5 мл пробирки с использованием наконечников с фильтром и плотно закройте (завинтите) колпачками.
- Меняйте наконечники в процессе смены реагентов
- Всегда используйте новую аликвоту воды для молекулярного исследования

- Приготовьте «мастер микс»: в начале PNM и потом добавьте ДНК полимеразу
- Всегда открывайте только один флакон реагента в одно и то же время, после использования флаконы положите обратно в мини-холодильник
- Осторожно (не разрушите праймеры!) поместите флакон «мастер микса», для вращения в центрифугу на 10-15 сек

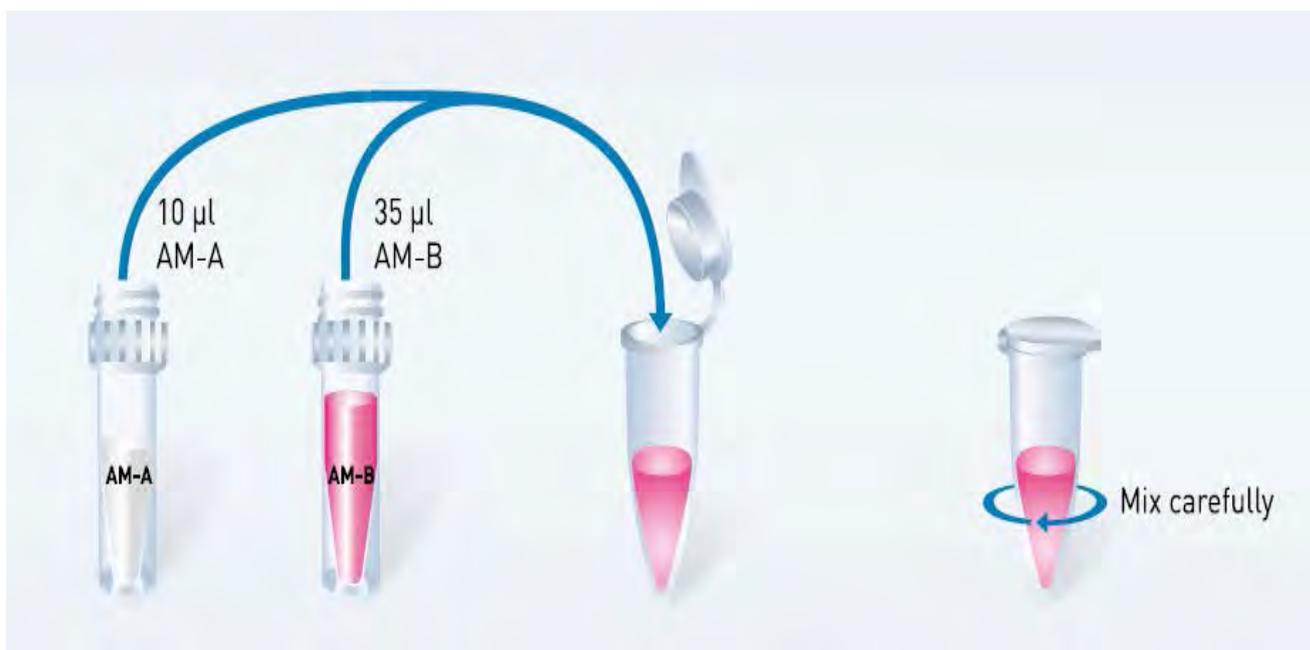


	Количество пробирок (тестов)								
	1	2	3	5	7	8	10	11	12
PNM	35 µl	70 µl	105 µl	175 µl	245 µl	280 µl	350 µl	385 µl	420 µl
Buffer	5 µl	10 µl	15 µl	25 µl	35 µl	40 µl	50 µl	55 µl	60 µl
MgCl ₂	2 µl	4µl	6 µl	10 µl	14 µl	16 µl	20 µl	22 µl	24 µl
H ₂ O	3 µl	6 µl	9 µl	15 µl	21 µl	24 µl	33 µl	33 µl	36 µl
Taq polymerase	0.2µl	0.4µl	0.6µl	1.0µl	1.4µl	1.6µl	2.0µl	2.2µl	2.4µl

Рисунок 6. Состав и расчеты «мастер микс»

Версия 2.0

- После оттаивания, тщательно смешайте АМ-А и АМ-В
- «Мастер микс» должен быть свежеприготовленным
- Меняйте наконечники при смене реагентов
- Всегда используйте новую аликвоту воды для молекулярного исследования
- Всегда открывайте только один флакон реагента в одно и то же время, и после использования флаконы положите обратно в мини-холодильник
- Осторожно (не разрушите праймеры!) смешивайте содержимое флакона «мастер микса», путем легкого вращения, не встряхивая



	Количество пробирок (тестов)								
	1	2	3	5	7	8	10	11	12
AM-A	10 µl	20 µl	30 µl	50 µl	70 µl	80 µl	100 µl	110 µl	120 µl
AM-B	35 µl	70 µl	105 µl	175 µl	245 µl	280 µl	350 µl	385 µl	420 µl

Рисунок 7. Добавление растворов АМ-А и АМ-В

Версия 1.0 и 2.0

- Отметьте ПЦР пробирки в соответствии с номерами ваших образцов и контролей на вашем рабочем листе
- Поместите ПЦР пробирки в штатив ПЦР-пробирок
- Добавьте 45 мкл «мастер микс» в каждую ПЦР пробирку, используя дозатор с наконечником с фильтром
- Добавьте 5 мкл стерильной воды для молекулярного исследования, в отрицательный контроль ПЦР «мастер микса»
- Закрывать ПЦР пробирки крышками и поместить их в стерильную стеклянную мензурку, покрытую алюминиевой фольгой (сделать отверстия в фольге для флаконов)

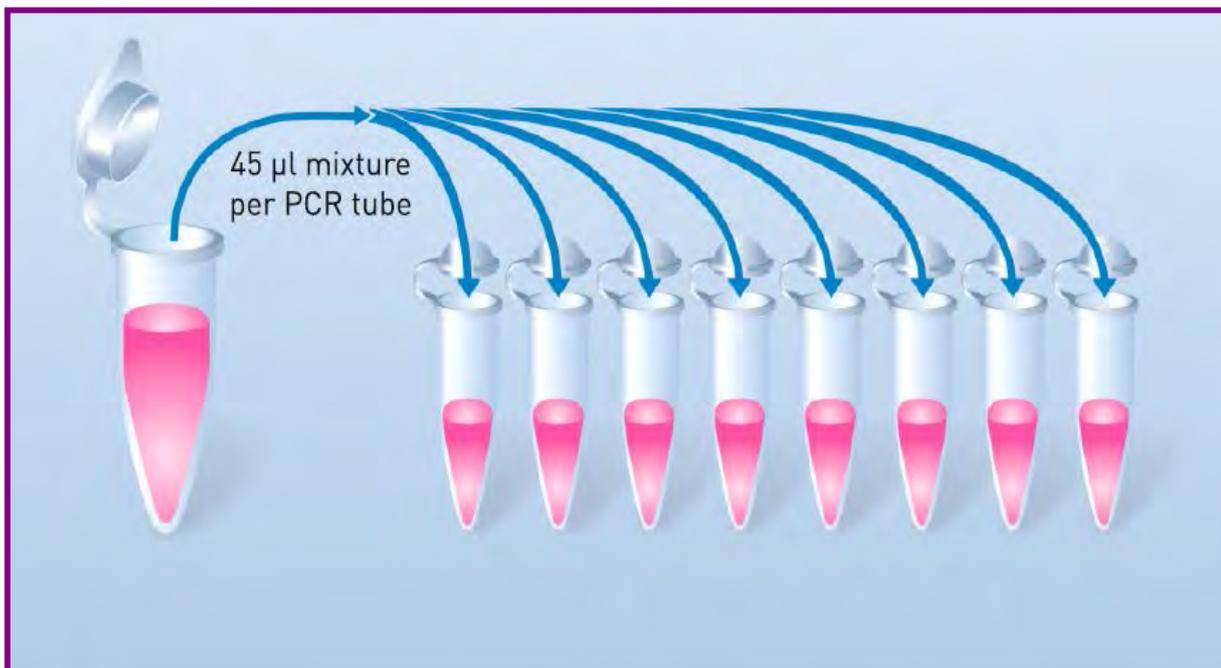


Рисунок 8. Добавление «мастер микс» в каждую пробирку

- После каждого использования, пипетки, штативы, инструменты и шкаф безопасности обработать свежеприготовленным 1% раствором хлора (20 мин экспозиция), затем 70% спиртом и УФО-облучателем.
- Использовать отдельно колбы или стаканы для каждой зоны (отдельные стаканы для очистки поверхностей и инструментов)

- Средства и инструменты, которые используются здесь, должны быть маркированы соответствующим образом и не должны быть использованы в других местах
- ПЦР пробирки переносят в зону приготовления образцов только в стакане, покрытом алюминиевой фольгой
- Нельзя возвращать этот стакан в зону подготовки реагентов без обработки 1% хлором.

3.2.4. Амплификация и гибридизация (2 этап)

АМПЛИФИКАЦИЯ

Установка Термоциклера для Версии 1.0

Поместите пробирки для ПЦР в термоциклер. Запрограммируйте и выполните следующий протокол для «прямых» клинических образцов и образцов из культур:

- денатурация при 95°C в течение 15 мин;
 - 10 циклов денатурации при 95°C в течение 30 сек.; элонгация при температуре 58 ° C в течение 2 мин;
 - еще 30 циклов для «прямых образцов», а для образцов из культур 20 циклов: денатурации при 95°C в течение 25 секунд, отжиг при температуре 53 ° C в течение 40 секунд, элонгация при 70 ° C в течение 40 сек;
 - Окончательный этап амплификации при 70°C в течение 8 мин.

Программа Термоциклера

Версия 1.0

Образцы из культур	Образцы из клинического материала	
5 min 95°C	1 цикл	1 цикл
30 sec } 95°C 2 min } 58°C	10 циклов	10 циклов
25 sec } 95°C 40 sec } 53°C 40 sec } 70°C	20 циклов	30 циклов
8 min 70°C	1 цикл	1 цикл

Установка термоциклера для Версии 2.0

Поместите пробирки для ПЦР в Термоциклер. Запрограммируйте и выполните следующий протокол для клинических образцов:

Денатурация при 95°C в течение 15 мин;

- 20 циклов денатурации для «прямых образцов», а для образцов из культур 10 циклов при 95 °C в течение 30 сек элонгация при температуре 65 ° C в течение 2 мин;
- еще 30 циклов денатурации для «прямых образцов», а для образцов из культур 20 циклов при 95 °C в течение 25 секунд, отжиг при температуре 50 ° C в течение 40 секунд, элонгация при 70 ° C в течение 40 сек;
- Окончательный этап амплификации при 70 °C в течение 8 мин.

Программа Термоциклера

Версия 2.0

Образцы культур		Образцы клинического материала
15 min 95°C		1 цикл
30 sec 95°C	}	1 цикл
2 min 65°C		10 циклов
25 sec 95°C	}	20 циклов
40 sec 50°C		20 циклов
40 sec 70°C		30 циклов
8 min 70°C		1 цикл

ГИБРИДИЗАЦИЯ (версия 1.0 и 2.0 одинаковы)

Подготовка реагентов

- Используйте чистый / новый пинцет для стрипов, положите их на чистый лист бумаги и обозначьте
- Предварительно нагрейте до комнатной температуры раствор для промывания (RIN) и стерильную дистиллированную воду
- Используйте подходящие пробирки (15 мл или 50 мл фалконовские пробирки), разведите концентрат конъюгата (CON-C) на 1:100 с растворителем конъюгата (CON-D)
- Используйте подходящие пробирки (15 мл или 50 мл фалконовские пробирки), разведите концентрат субстрата (SUB-C) 1:100 растворителем субстрата (SUB-D)
- Используйте новые пробирки для разведения для каждого запуска
- Для каждой полосы, добавьте 10 мкл концентрата до 1 мл соответствующего разведения буфера
- Держите (CON-C) и (CON-D) охлажденными
- Включите термошейкер и запустите программу, чтобы он мог нагреться до 45 ° C
- Проверьте температуру

- Предварительно нагрейте буфер гибридизации (HYB) и раствор (STR) до 37-45 ° C на водяной бане
- Реагенты не должны содержать осадков!



Рисунок 9. Термошейкер для гибридизации

- Используйте чистый / новый лоток
- Добавьте 20 мл раствора денатурации (DEN) в угол каждого желоба (корыто), нет необходимости менять наконечники
- Добавьте 20 мкл ампликонов в DEN и тщательно перемешайте с помощью пипетки вверх и вниз 5 раз, смените наконечники
- Не допускайте попадания смеси и загрязнения соседних желобов
- Используемые наконечники поместите в свежеприготовленный 1% раствор хлора

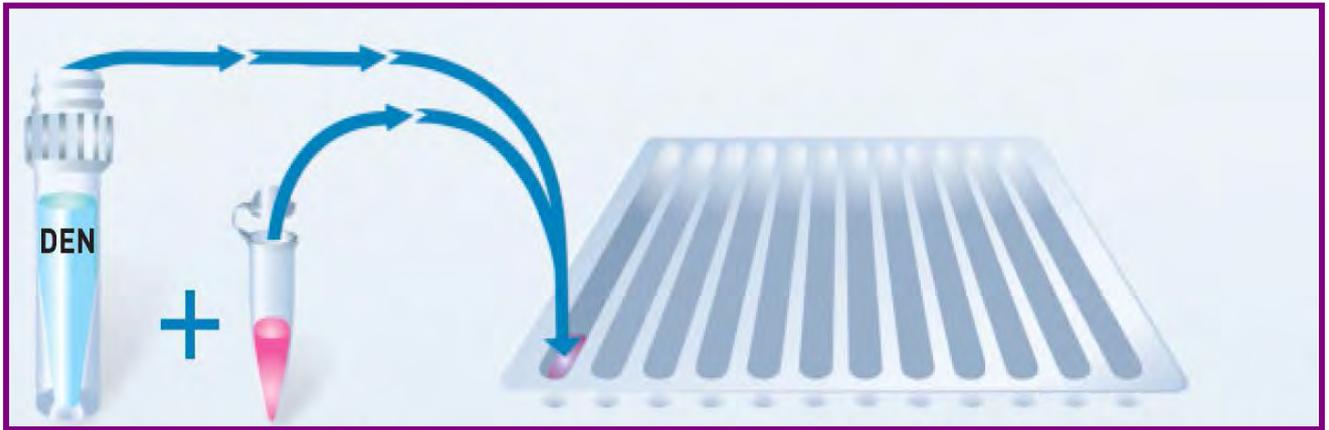


Рисунок 10. Гибридизация, добавление ампликонов

- Аккуратно добавить 1 мл подогретого до 45⁰С НУВ буфера в каждый желоб с использованием наконечников с фильтром. Смените наконечники!
- Поместить необходимое количество реагентов (НУВ, STR, RIN) в 50 мл пробирки и использовать их в качестве запаса. Использовать длинные наконечники!
- Слегка встряхнуть желоба, чтобы смешать однородно НУВ с ампликонами.
- Не делать никаких «разливов» в соседние желоба.

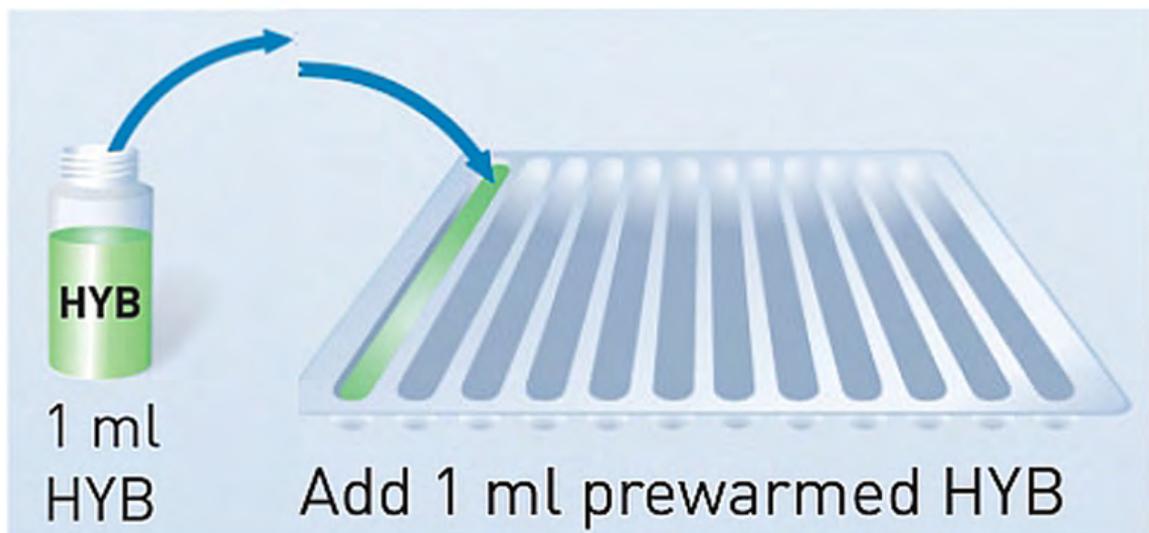


Рисунок 11. Добавление раствора НУВ для гибридизации

- Используйте чистый / новый пластиковый пинцет и положите нумерованные стрипы с лицевой стороны,
- Полосы должны быть полностью покрыты НУВ. Если полоски перевернутся, снова положите их, но новым наконечником пипетки
- Положите лоток на термошейкер и нажмите START
- Инкубируйте лоток при 45 ° С в течение 30 минут
- При звонке будильника, нажмите кнопку со стрелкой вправо, чтобы остановить
- Полностью аспирируйте НУВ пастеровской пипеткой, смените пипетки
- Не переливать содержимое раствора лотка в раковину или банку, что может загрязнять рабочую зону! (лучше в коробку из под наконечников)

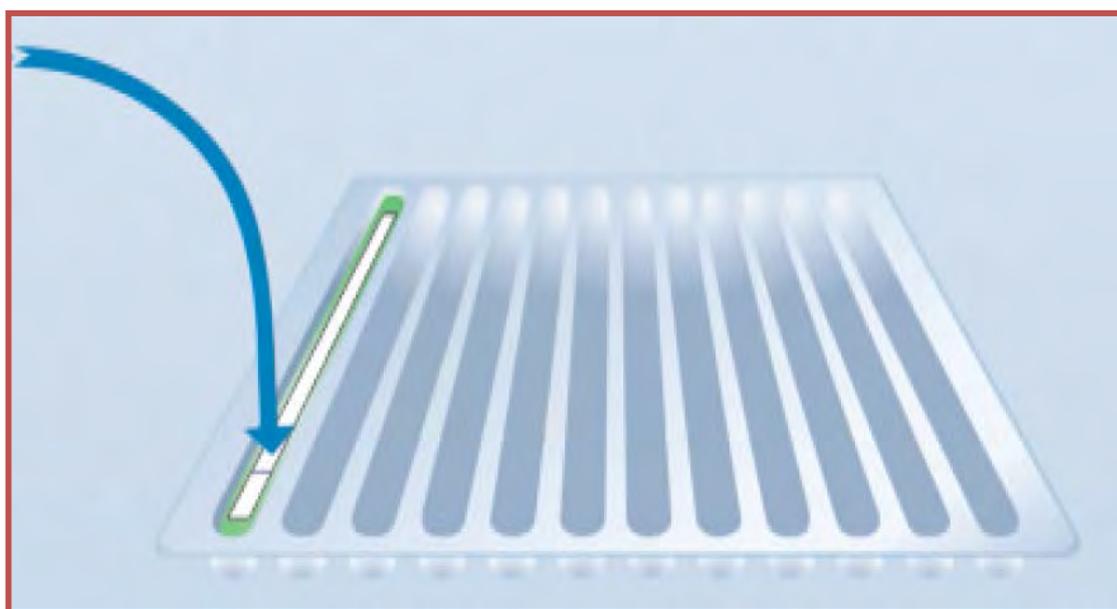


Рисунок 12. Стрипы в термошейкере

- Вытрите конденсат, который образуется на крышке перед каждой инкубацией
- Добавьте 1 мл STR раствора в каждой желоб (корыта)
- Нажмите кнопку со стрелкой вправо и инкубируйте лоток (поднос) в течение 15 мин при 45°C в термошейкере

- При звонке будильника, нажмите кнопку со стрелкой вправо, чтобы остановить
- Полностью аспирируйте STR раствор пастеровской пипеткой (не касаясь стрипов, только в углу желоба), смените пипетки
- Не переливайте содержимое раствора лотка в раковину или банки, которые могут загрязнять рабочую зону!

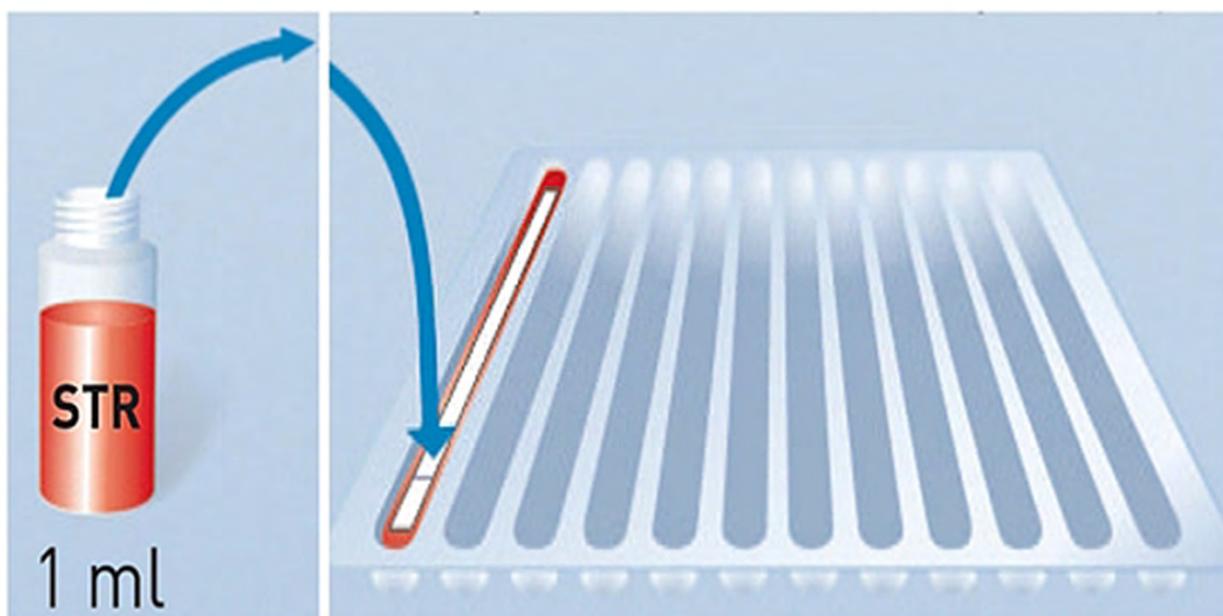


Рисунок 13. Добавление STR в каждый желоб

- Промыть каждый стрип один раз полосканием в 1 мл (RIN) раствора в течение 1 мин на термошейкере комнатной температуры, нет необходимости менять наконечники между желобами
- При звонке будильника, нажмите кнопку со стрелкой вправо, чтобы остановить
- Полностью аспирируйте раствор RIN пастеровской пипеткой, нет необходимости менять пипетки между желобами
- Содержимое раствора в желобе сливайте в контейнер с 1% хлорсодержащим средством.

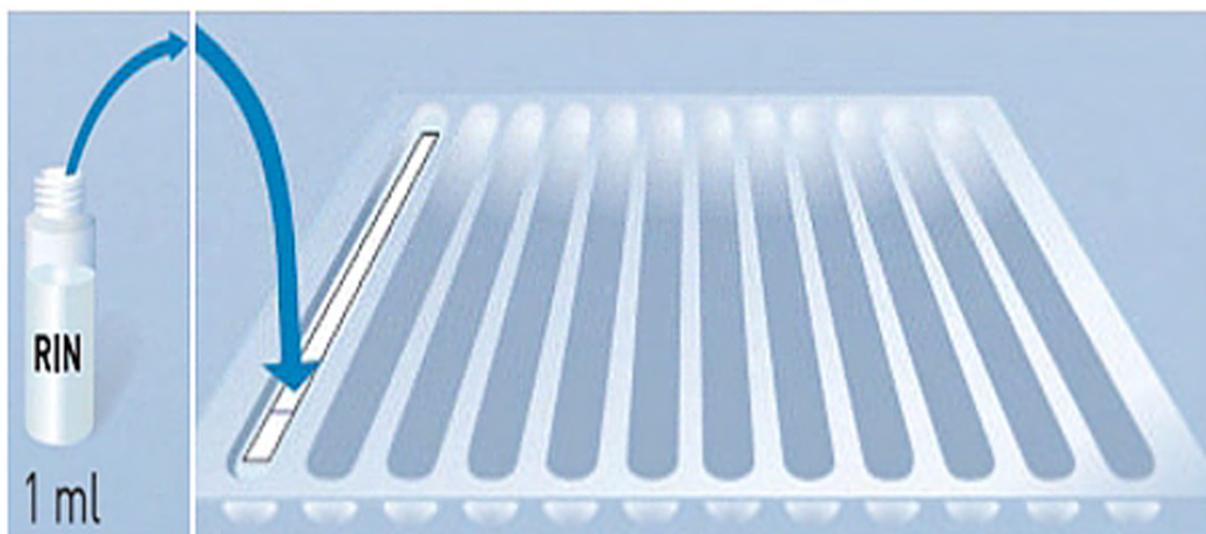


Рисунок 14. Промывание стрипов раствором RIN

- Добавьте 1 мл разведенного раствора конъюгата (CON-D) в каждый желоб, не нужно менять наконечники
- Нажмите кнопку со стрелкой вправо и инкубируйте в течение 30 минут в термошейкере комнатной температуре
- При звонке будильника, нажмите кнопку со стрелкой вправо, чтобы остановить
- Полностью аспирируйте раствор CON-D, пастеровской пипеткой, нет необходимости менять пипетки между желобами
- Содержимое раствора в желобе сливайте в раствор с 1% хлорсодержащим средством.



Рисунок 15. Добавление конъюгата в каждый желоб

- Промывайте каждый стрип (полоску) дважды в 1 мл (RIN) раствора в течение 1 мин в термошейкере комнатной температуры, нет необходимости менять наконечники между желобами
- При звонке будильника, нажмите кнопку со стрелкой вправо, чтобы остановить
- Полностью аспирируйте раствор RIN пастеровской пипеткой, нет необходимости менять пипетки между желобами
- Содержимое раствора в желобе можно сливать в раствор с 1% хлором
- Повторить процедуру еще один раз

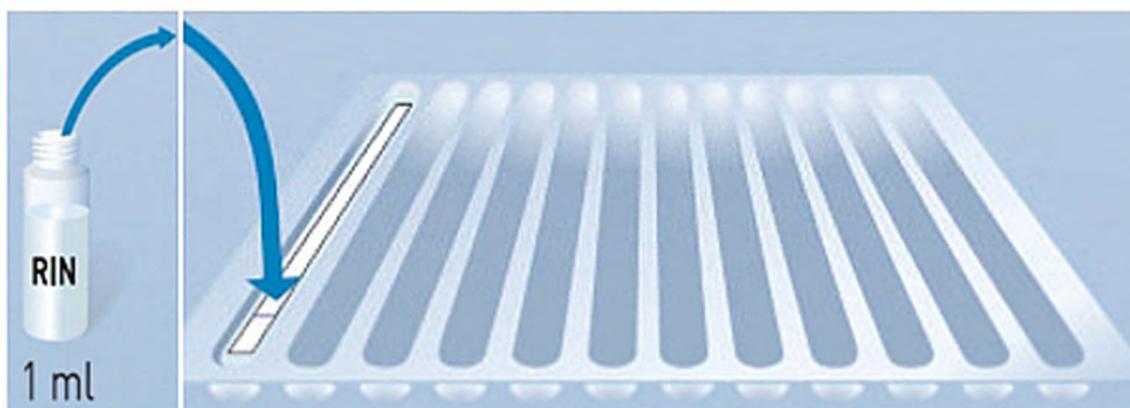


Рисунок 16.Промывание стрипов раствором RIN

- Промойте каждый стрип (полосу) один раз в 1 мл стерильной дистиллированной воды (H₂O) в течение 1 мин на Twincubator, нет необходимости менять наконечник
- При звонке будильника, нажмите кнопку со стрелкой вправо, чтобы остановить
- Полностью аспирируйте воду пастеровской пипеткой, нет необходимости менять пипетки между желобами
- Содержимое раствора в желобе сливайте в раствор с 1% хлорсодержащим средством.

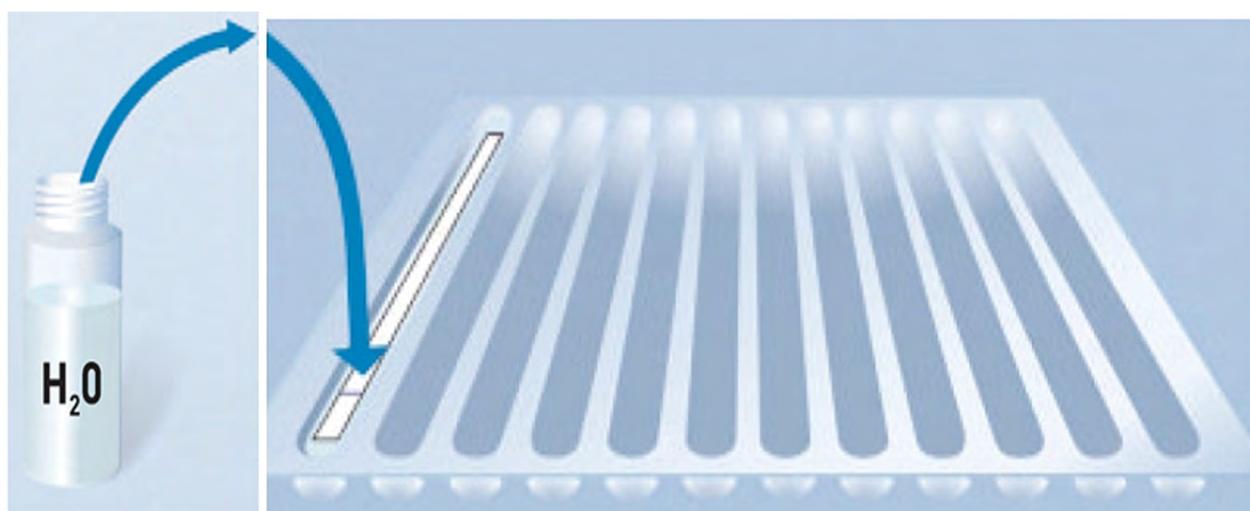


Рисунок 17. Промывание стрипов водой

- Добавьте 1 мл разведенного субстрата (SUB-D) в каждый желоб, не нужно менять наконечники;

- Нажмите кнопку со стрелкой вправо и инкубируйте в течение 3 - 20 мин на TwinCubator при комнатной температуре;
- При звонке будильника, нажмите кнопку со стрелкой вправо, чтобы остановить;
- Закройте лоток (поднос) алюминиевой фольгой;
- Полностью аспирируйте раствор SUB-D пипеткой Пастера, нет необходимости менять пипетки между желобами;
- Содержимое раствора в желобе сливайте в раствор с 1% хлорсодержащим средством.

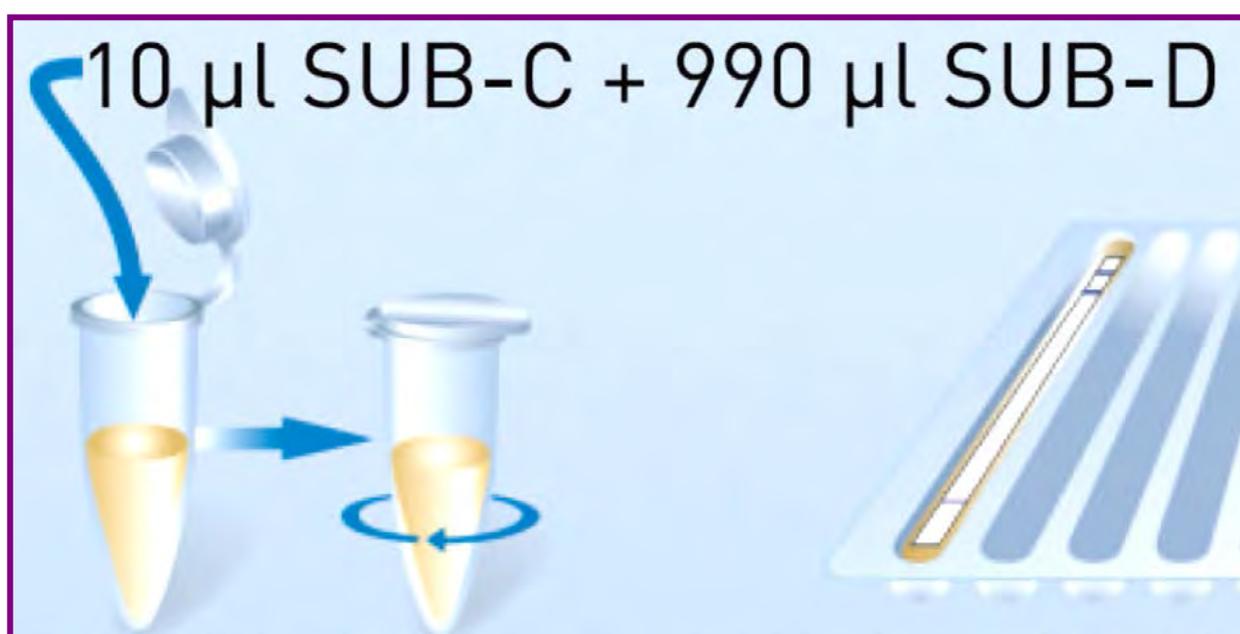


Рисунок 18. Добавление концентрата и растворителя субстрата

- Промойте каждый стрип дважды 1 мл стерильной дистиллированной воды в течение 1 мин в термошейкере комнатной температуры для остановки реакции окрашивания
- Полностью аспирируйте воду пастеровской пипеткой, нет необходимости менять пипетки между желобами.
- Содержимое раствора в желобе сливайте в раствор с 1% отбеливателем (хлором)
- Используя чистый пинцет, удалите стрипы из лотка и высушите их между двумя слоями фильтровальной бумаги

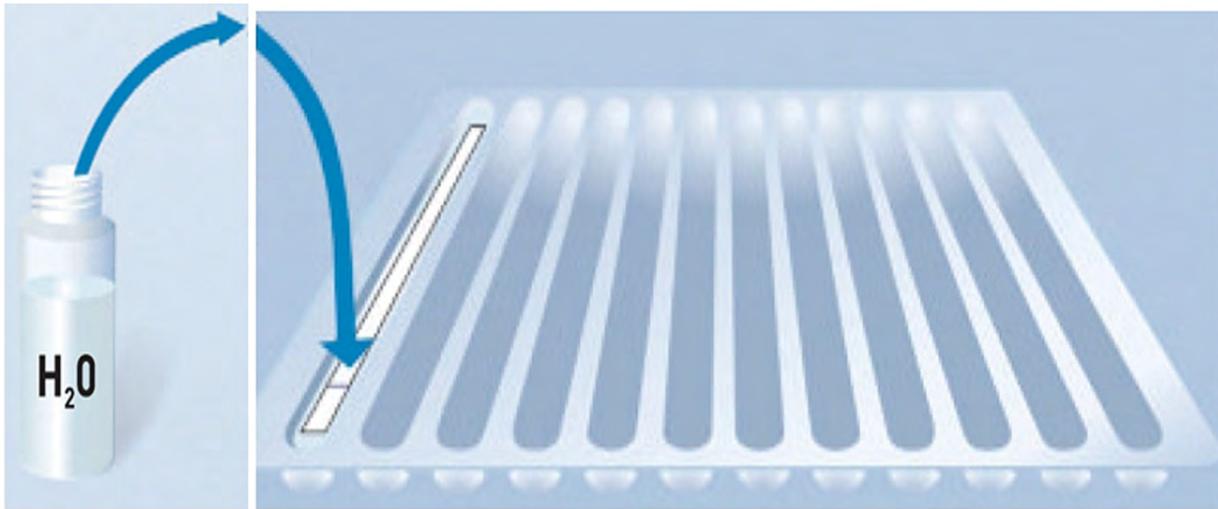


Рисунок 19. Промывание стрипов стерильной водой

- Очистите пипетки, штативы, инструменты и рабочую зону свежеприготовленным 1% раствором хлора (экспозиция 20 мин), затем 70% спиртом после каждого использования.
- Очистите полосы лотка (подноса), свежеприготовленным 1% раствором хлора (20 мин экспозиция), далее стерильной дистиллированной водой.
- Используйте выделенные только для этой зоны: «спрей» бутылки или стаканы (причем должны быть отдельные стаканы для очистки поверхностей и инструментов)

Инструменты:

- Средства и инструменты, используемые здесь, должны быть маркированы соответствующим образом и не могут быть использованы в других местах
- Никогда не переносите ничего из этой зоны в зону подготовки реагентов или образцов
- Не используйте повторно фалконовские пробирки для подготовки конъюгата и субстрата

Надлежащая лабораторная практика:

- Приготовьте образцы на следующий день (заранее), и заморозьте экстрагированную ДНК
- Приступайте к подготовке реагентов и амплификации / детекции на следующий день

- Таким образом, работа может быть четко однонаправленной
- Добавьте экстракт ДНК в ПЦР пробирки в специальном ламинарном боксе ПЦР (использовать бокс только для экстракции ДНК)
- Если возможно, используйте ламинарный бокс только для молекулярных работ
- Не переливайте растворы из желобов лотка в раковину или любой другой контейнер на этапе гибридизации. Это приведет к загрязнению рабочей области!
- Смените перчатки, если они загрязнены ампликонами
- Деконтаминируйте лотки и пинцет УФО ламинарного бокса.
- Соблюдайте чистоту лотков (подносов) стрипов и пинцетов, после очистки запечатайте их в стерильный пластиковый пакет.

3.2.5. Интерпретация результатов

- Совместите полосы контроля конъюгата (СС) и контроля амплификации (АС) на каждой полосе с соответствующими линиями на листе.
- Лентой скотча фиксируйте каждую полосу на соответствующую линию на листе.
- Сопоставьте положительные контроли исследуемых образцов со стандартами - диаграммами и отметьте результаты на листе.
- Полосы должны рассматриваться положительно только в том случае, если они отчетливо выражены (или более), чем контроль амплификации (АС).
- Храните листы вместе с полосками, держите их в защищенном от света месте.
- Не все полоски на стрипе могут показывать одинаковую силу сигнала. На каждом стрипе 27 зон реакции

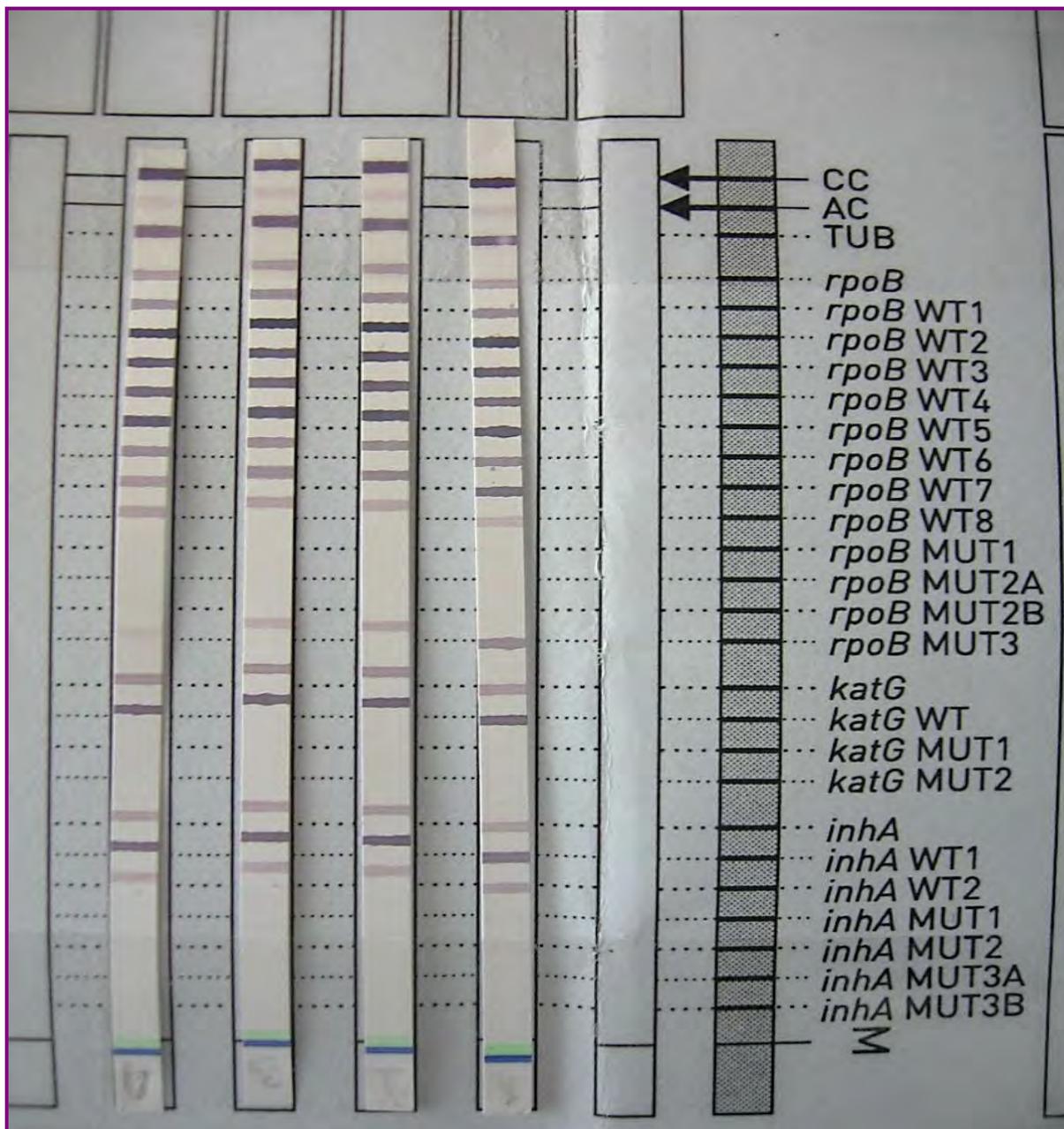


Рисунок 20. Оценка результатов GenoType® MTBDRplus
(27 зон реакции)

- Должна присутствовать линия контроля конъюгата (CC).
- Если CC является отрицательным (не появляется), то реакция конъюгации или субстрата была неудачной, либо из-за ошибки в процедуре или из-за проблем с реагентом.

Identification of the *M. tuberculosis* complex and its resistance to Rifampicin and/or Isoniazid using the GenoType[®] MTBDRplus

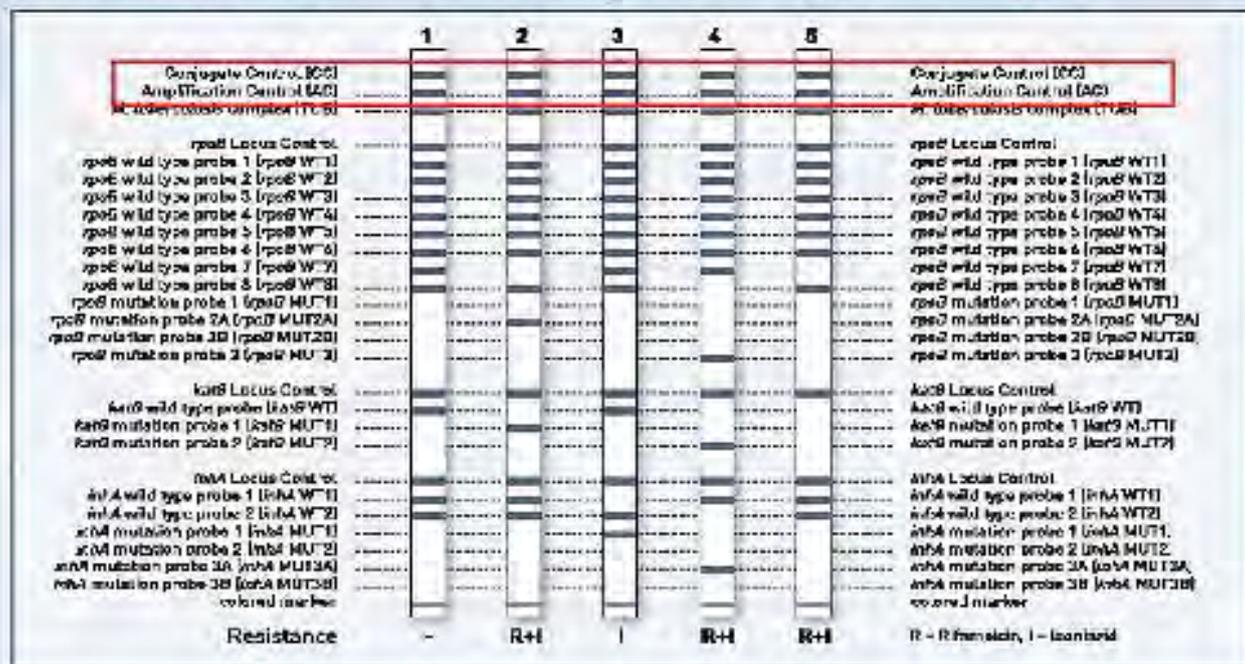


Рисунок 21. Определение тубкомплекса и резистентности к рифампицину и изониазиду в GenoType[®] MTBDRplus (контроль конъюгата)

- Линия контроля амплификации (АС) определяет внутренний контроль, который специфичен для всех известных в настоящее время микобактерий, а также грамположительных бактерий с высоким содержанием G+ C. Таким образом, этот контроль не является конкретным для микобактерии!
- Если АС является положительным, ошибки при выделении ДНК и амплификации и присутствие ингибиторов амплификации в образце могут быть исключены.
- В случае положительного результата тестирования, сигнал в зоне контроля амплификации (АС) может быть слабым или даже невидимым, это может быть вызвано конкурентными реакциями между АС и TUB, rpoB, katG, inhA в процессе амплификации. Тем не менее, в этом случае, реакция амплификации не требует повторения и считается успешной. Если же результат отрицательный или отсутствует полоска АС, то это указывает на ошибку во время проведения

амплификации, либо влияния ингибиторов. В этом случае тестирование надо повторить [8,9].

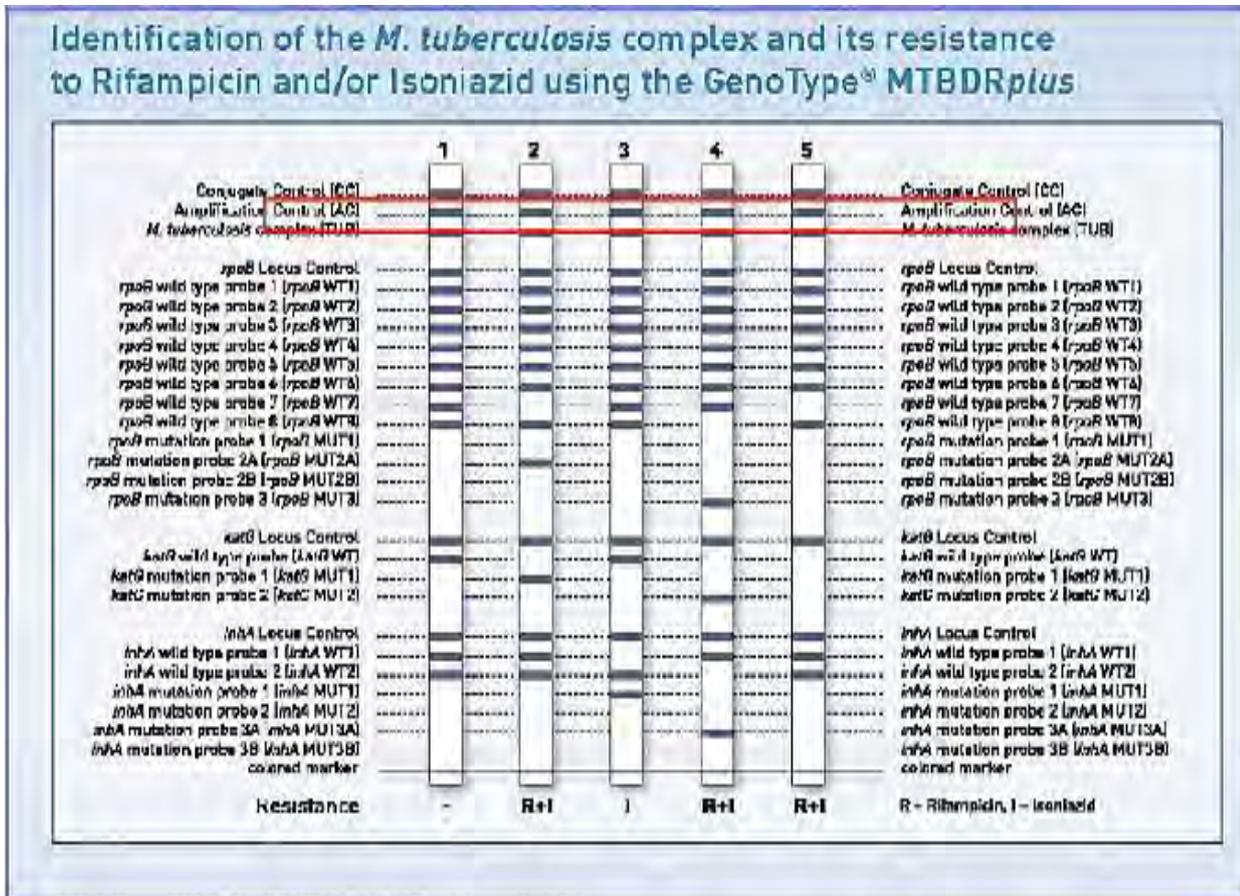


Рисунок 22. Определение тубкомплеса и резистентности к рифампицину и изониазиду в GenoType® MTBDRplus (вариант присутствия сигнала AC)

- Слабый сигнал или отсутствие сигнала AC в сочетании с отрицательными результатами теста: TUB, rpoB, katG и inhA локусов контролей, может указывать на потенциальные ошибки при выделении ДНК и амплификации, или наличии ингибиторов амплификации, в этом случае, тест должен быть признан недействительным, а реакция повторена.
- Все полосы (кроме CC) должна быть ярче по сравнению AC .
- Полосы, которые имеют меньшую яркость, чем полоса AC не должны быть оценены и на них не дается ответ.

- Полоса АС всегда должна быть положительной даже при наличии других отрицательных контролей, что указывает на правильно проведенную реакцию амплификации и отсутствие ингибиторов.

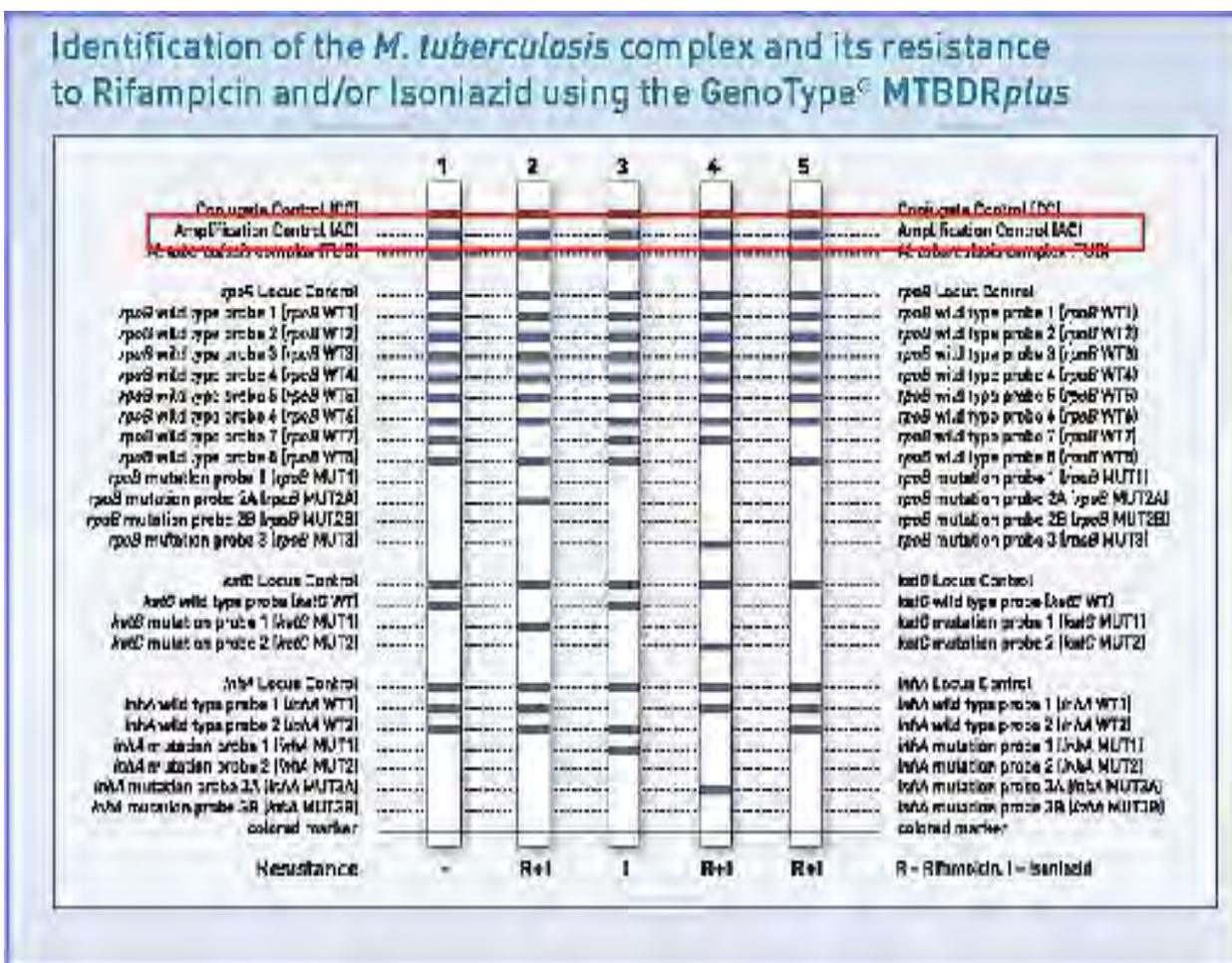


Рисунок 23. Определение тубкомплекса и резистентности к рифампицину и изониазиду в GenoType® MTBDRplus (вариант наличия сигнала TUB)

- Сигнал полосы TUB свидетельствует о присутствии комплекса *M. Tuberculosis*.
- Если TUB зона является отрицательной, то бактерии не принадлежат к туберкулезному комплексу, следовательно, наличие или отсутствие других полос (за исключением CC и AC) не может рассматриваться для оценки [8,9].

Identification of the *M. tuberculosis* complex and its resistance to Rifampicin and/or Isoniazid using the GenoType® MTBDRplus

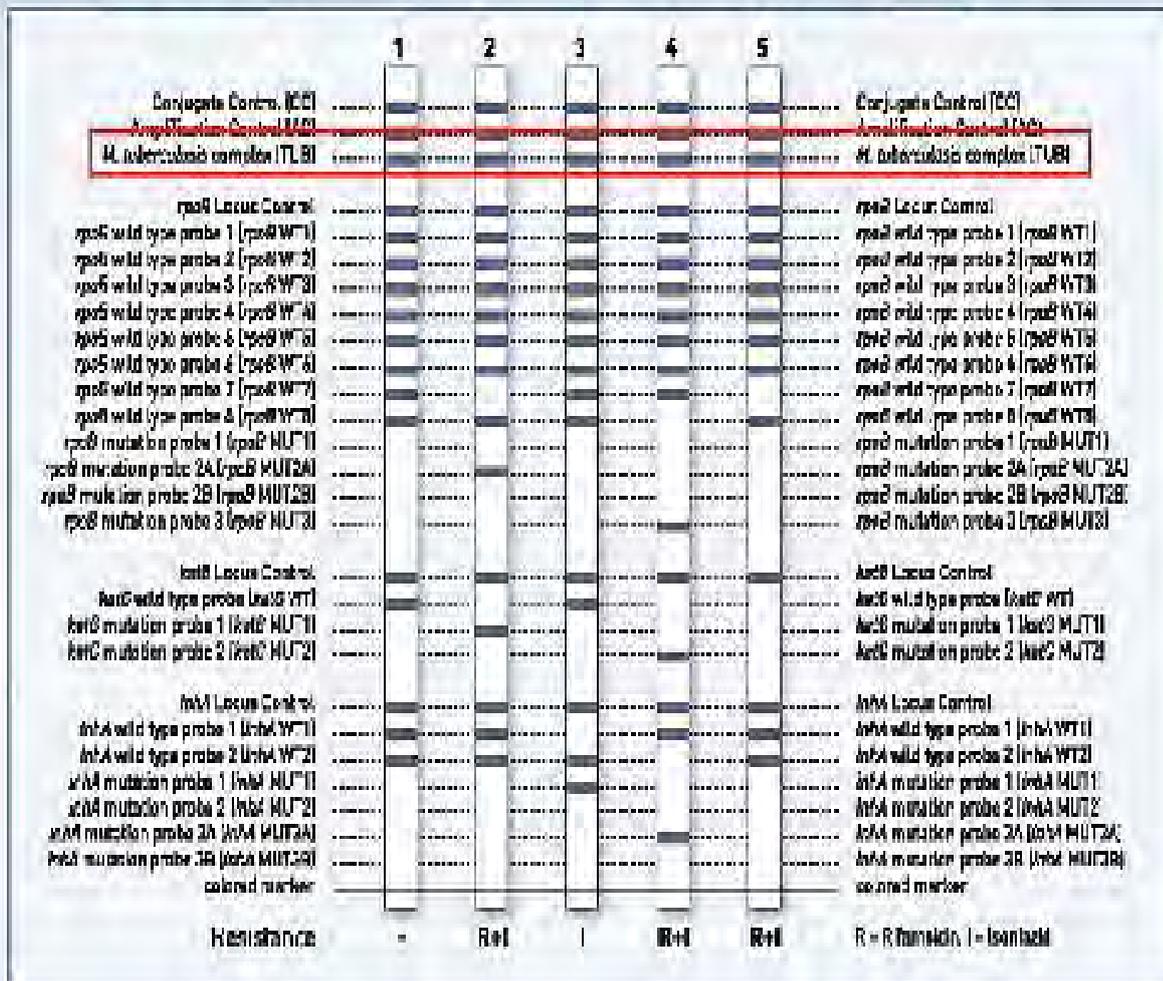


Рисунок 24. Определение тубкомплеса и резистентности к рифампицину и изониазиду в GenoType® MTBDRplus (оценка сигнала TUB)

- Локусы контроля зоны (groV, katG, inhA) обнаруживают ген специфичного региона для соответствующих генов.
- Если зоны контроля локусов отрицательные, и их соответствующие мутации показывают положительные полосы, этот результат не может рассматриваться для оценки [9].

Identification of the *M. tuberculosis* complex and its resistance to Rifampicin and/or Isoniazid using the GenoType® MTBDRplus

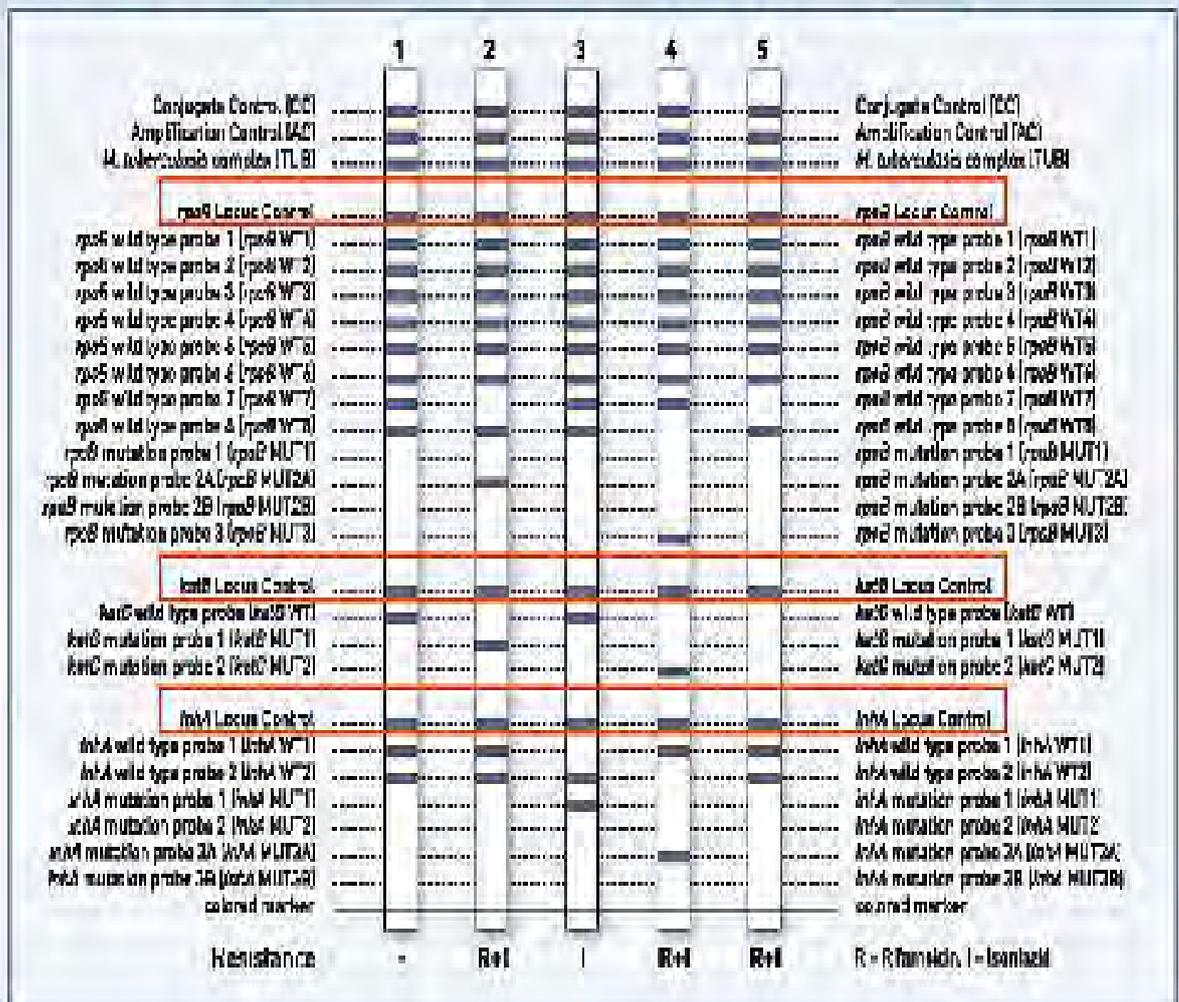


Рисунок 25. Определение тубкомплеса и резистентности к рифампицину и изониазиду в GenoType® MTBDRplus (зоны контроля groV, katG, inhA)

Чувствительность:

- Только те полосы, интенсивность которых примерно так же выражена, как AC (или сильнее), должны быть рассмотрены и интерпретированы.
- Зонды дикого типа тесно связаны с резистентностью и мутациями в конкретных генах.

- Когда полосы всех зондов дикого типа гена являются положительными, и не обнаружено мутации в пределах рассматриваемой области - протестированные штаммы можно считать чувствительными для соответствующего антибиотика.

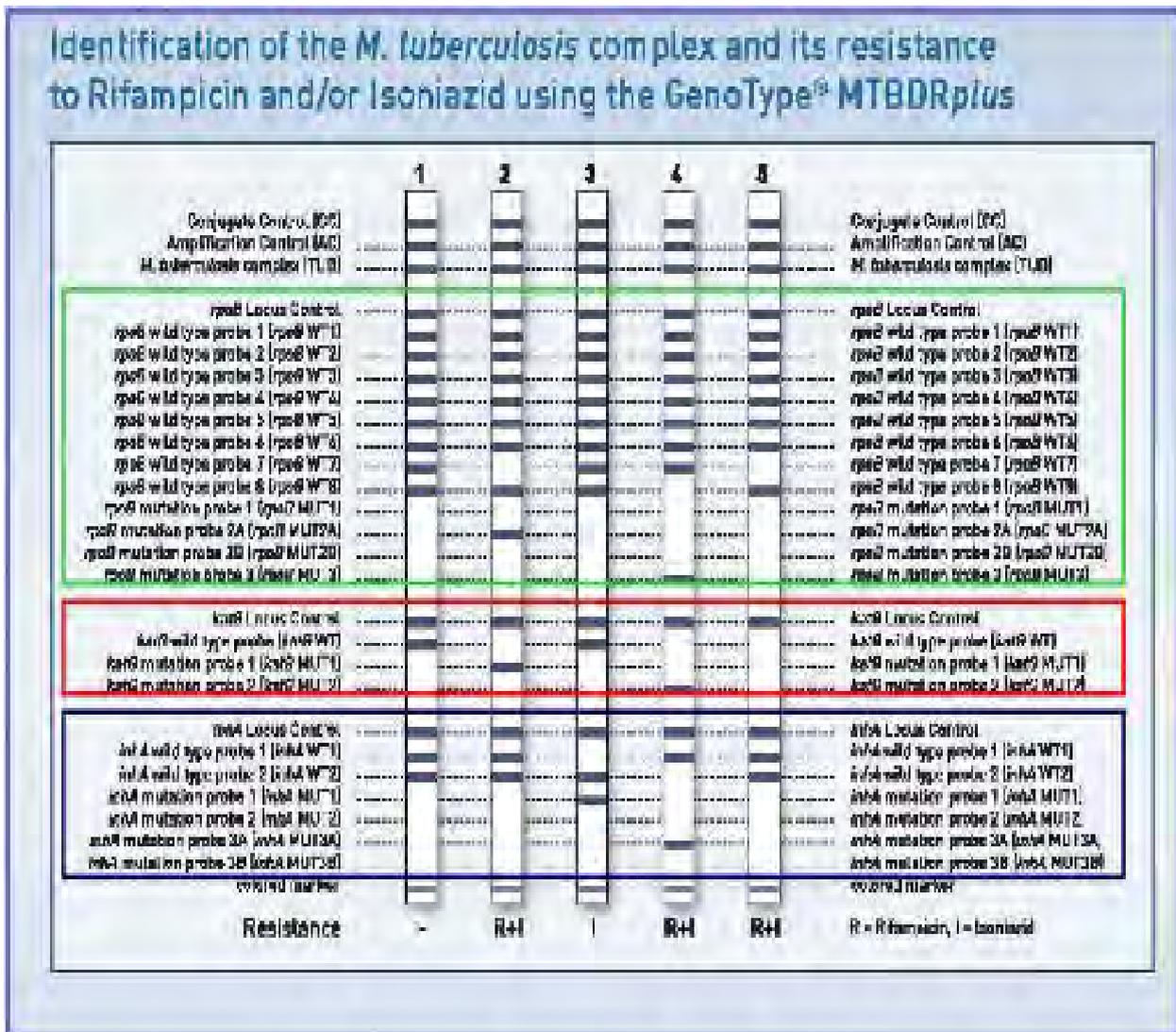


Рисунок 26. Определение тубкомплекса и резистентности к рифампицину и изониазиду в GenoType® MTBDRplus (зонды дикого типа WT1)

Резистентность:

- В случае мутации, соответствующие ампликоны не могут связываться с соответствующим зондом захвата дикого типа на полосе из-за несовпадения.

- Отсутствие сигнала по крайней мере в одном из зондов дикого типа может предсказать наличие устойчивости к соответствующему антибиотику, препарату.
- Положительный сигнал с мутацией конкретного зонда - может предсказать устойчивость к соответствующему антибиотику непосредственно.
- Наличие редких мутаций, которые не имеют специфических зондов захвата, может быть подтверждено выпадением одного из диких штаммов, но отсутствием мутационных полос, что также интерпретируется как положительный результат и считается резистентным.

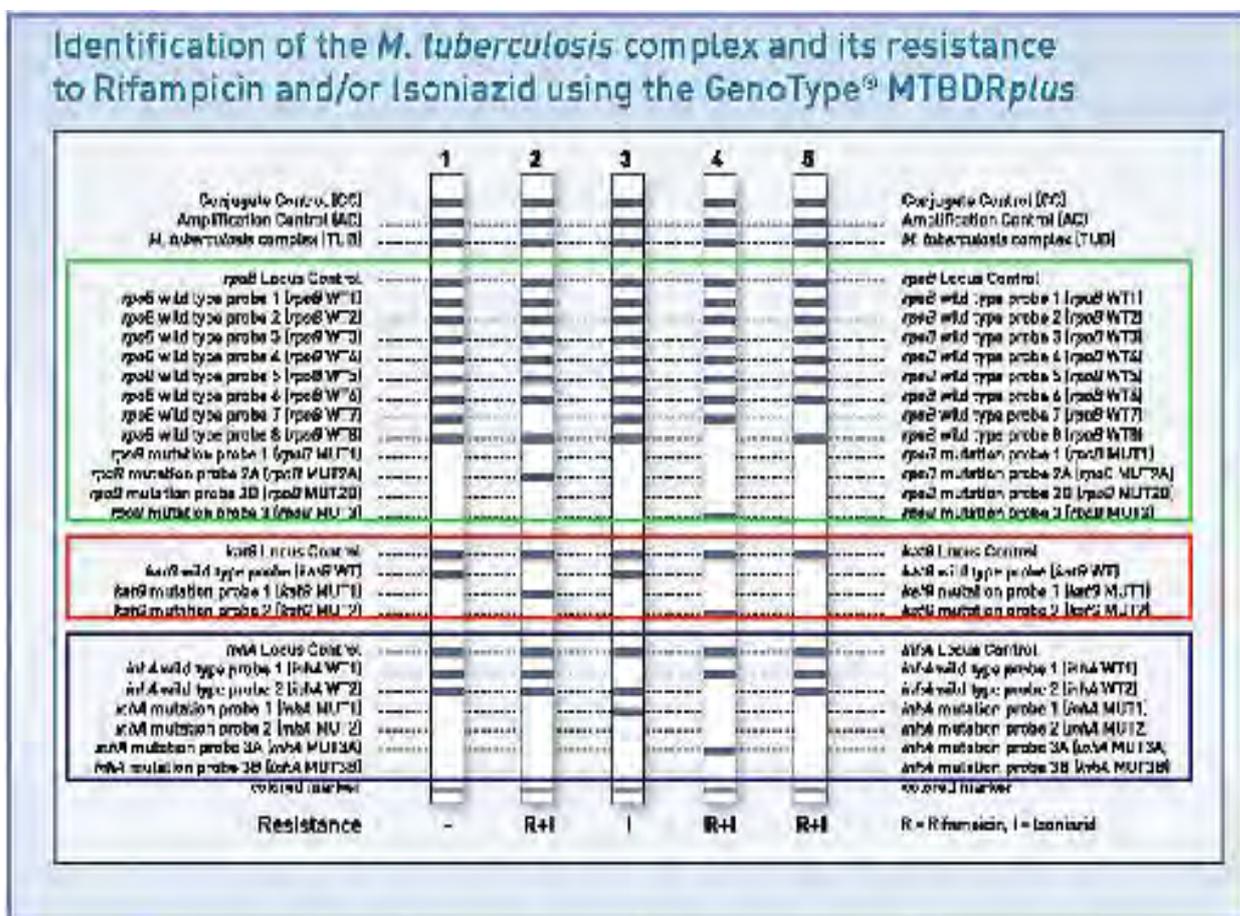


Рисунок 27. Определение тубкомплекса и резистентности к рифампицину и изониазиду в GenoType® MTBDRplus (мутации в katG ген)

- Зонды дикого типа rpoB гена: с WT 1 до WT 8.
- Зонды специфических мутаций rpoB гена: MUT D516V, H526Y, H526D, S531L .

- Обнаружение мутаций:
- Отсутствие сигналов диких типов.
- Наличие сигналов общих специфических мутаций.

Высокий уровень резистентности к изониазиду: katG ген

Мутации в katG и соответствующий дикий тип, смешанный штамм

- Гетеро резистентные – равное представление чувствительных и устойчивых мутантов одном и том же штамме
- На стрипе может проявляться как одна из мутантных проб, так и соответствующая проба дикого типа. Будет ли это фенотипически обусловлено зависит от соотношения мутантных и не мутантных последовательностей.
- Смешанная модель - взаимное присутствие устойчивого штамма и второго - чувствительного. Причинами могут быть: не чистая культура, перенос загрязнений.

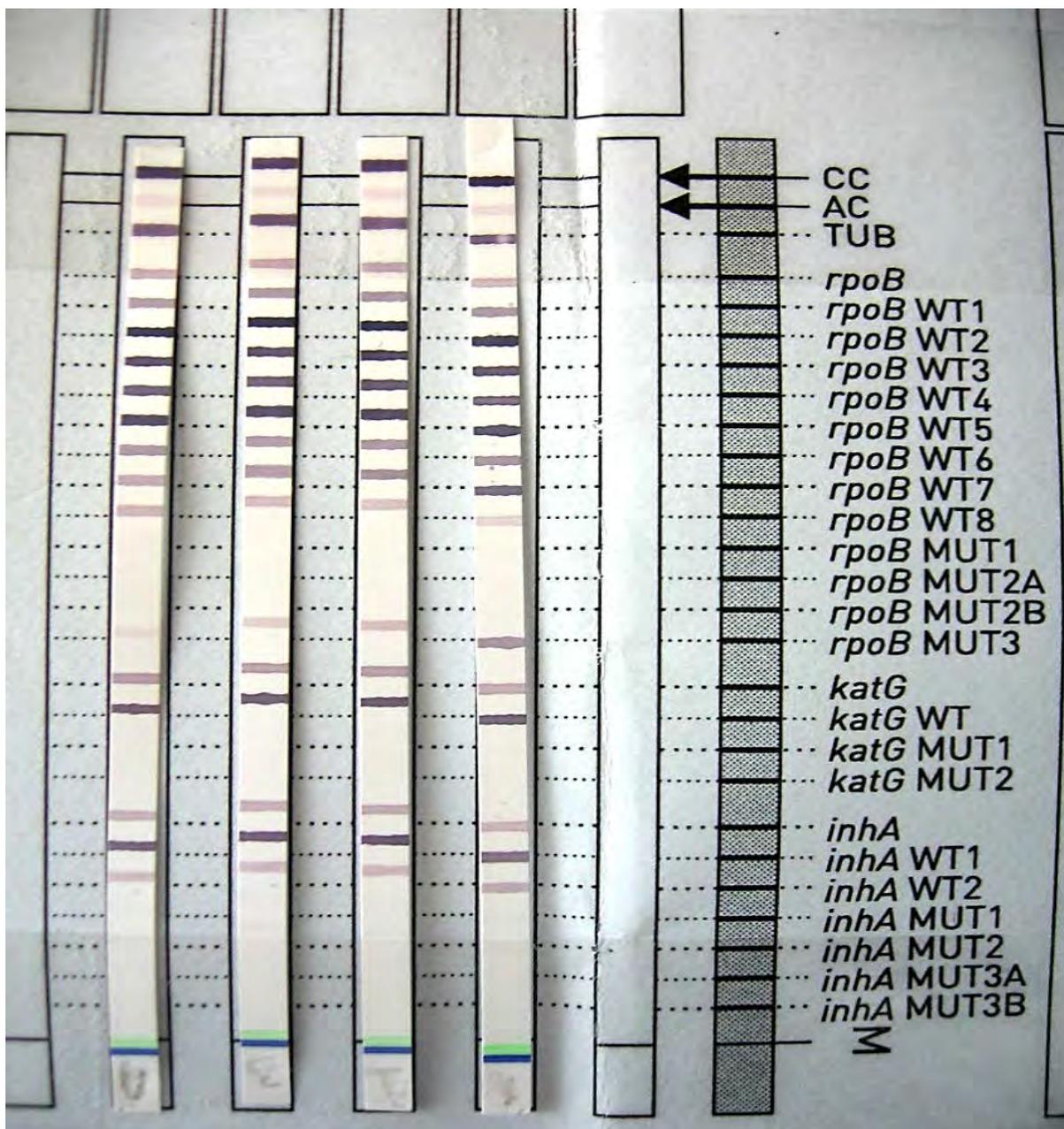


Рисунок 28. GenoType® MTBDRplus (смешанная модель)

Необходимо сравнить все молекулярные данными с другими лабораторными результатами, то есть с обычным тестированием лекарственной чувствительности и, если возможно, с клиническими данными [9-13].

3.3. GenoType®Mycobacterium CM

Молекулярно-генетическое исследование для идентификации клинически важных видов микобактерий, выделенных из культур

Методология

Тест GenoType®Mycobacterium CM (Common *Mycobacteria*) основывается на технологии DNA-STRIP® (ДНК-стрип) и позволяет идентифицировать следующие семейства микобактерий: *M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum* | *M. ulcerans*, комплекс *M. tuberculosis*, *M. xenopi*.

Процедура проведения теста подразделяется на три этапа:

Выделение ДНК из культур (выросших на плотной или жидкой среде; необходимые для этого реагенты в наборе не поставляются), мультиплексная амплификация с биотинилированными праймерами (необходимая термостабильная ДНК полимеразы не поставляется), реверс-гибридизация.

Гибридизация включает следующие этапы: химическая денатурация продуктов амплификации, гибридизация одноцепочечных ампликонов, меченых биотином, на мембраносвязанных зондах, тщательная отмывка, добавление конъюгата стрептовидина/щелочной фосфатазы и опосредованная щелочной фосфатазой, реакция окрашивания. Простая и быстрая оценка полученных результатов проводится с помощью прилагаемого шаблона.

Хранение и меры предосторожности

Смесь праймеров/нуклеотидов (РНМ) хранят при температуре 2-8°C строго изолировано от потенциальных источников контаминации ДНК.

Если необходимо более длительное хранение (более 4-х недель), то необходима - температура -20°C. Чтобы избежать повторных замораживаний и оттаиваний, рекомендуется аликвотировать РНМ. Все остальные компоненты набора хранить при 2-8°C. После окончания срока реактивы не использовать.

Образы от пациентов и культуры, полученные из этих образцов, всегда должны рассматриваться, как потенциально инфекционные.

Образцы от пациентов из группы риска и культуры, полученные из них, всегда должны быть промаркированы, и работать с ними необходимо, соблюдая все меры предосторожности. Необходимо всегда использовать защитную одежду и перчатки.

Обработку образцов и пробоподготовку, включая инактивацию при высокой температуре, надо проводить в ламинарном боксе II класса. Перед инактивацией при высокой температуре, пробы нужно центрифугировать с применением аэрозоль-непроницаемого ротора. Аэрозоль-непроницаемый ротор можно открывать исключительно в ламинарном боксе. После инактивации при высокой температуре может быть применен стандартный ротор для центрифугирования проб вне ламинарного бокса.

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.

При работе с компонентами набора необходимо обращать внимание на следующие особые меры безопасности: Денатурирующий Раствор (DEN) содержит <2% NaOH и действует раздражающе на глаза и кожу. Концентрат Субстрата (SUB-C) содержит диметилсульфоксид, который является сильным раздражителем.

Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта: www.hain-lifescience.com/lproducts/msds.html
Рисунки заимствованы у компании «Hain Lifescience GmbH».

Контроль качества

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

- Зона Контроля Конъюгата для проверки связывания конъюгата со стрипом и правильного выполнения хромогенной реакции

- Зона Универсального Контроля, которая улавливает все известные микобактерии и представителей группы грамположительных бактерий с высоким содержанием гуанина и цитозина
- Зона Контроля Рода, которая подтверждает присутствие представителей рода *Mycobacterium*

Выделение ДНК

Исходным материалом для теста могут быть бактерии, выросшие как на плотной среде (Левенштейна-Йенсена), так и в жидкой (например, на Бактеке). Тест не подходит для детекции микобактерий из прямого материала пациентов. Рабочая площадь должна быть чистой от амплифицированной ДНК. Решающим моментом является нагревание образцов до 95°C в течение 20 минут, чтобы обеспечить полный лизис клеток и инактивировать вегетативные бактерии. Можно применять любые методы выделения ДНК, позволяющие получить амплифицируемую ДНК из бактерий. Следующий краткий протокол позволяет получить ДНК, подходящую для амплификации:

1а. При работе с бактериями, выросшими на плотной среде, петлей отобрать бактерии и суспендировать в примерно 300 мкл воды (вода должна быть пригодна для молекулярно-биологических исследований).

1б. При работе с бактериями, выросшими на жидкой среде, в работу берется 1 мл. Бактерии осаждают при центрифугировании в течение 15 мин при 10000g в стандартной настольной центрифуге с аэрозоль-непроницаемым ротором в ламинарном боксе II класса. Супернатант слить, а бактерии ресуспендировать на вортексе в 100-300 мкл воды.

2. Инкубировать бактерии из пп. 1а и 1б на водяной бане 20 минут при 95°C.

3. Обработать пробу в ультразвуковой бане в течение 15 мин.

4. Центрифугировать пробу на максимальной скорости 5 мин, и использовать 5 мкл супернатанта для ПЦР. Если предполагается более длительное хранение, то раствор ДНК необходимо перенести в новую пробирку.

Амплификация

Подготовить амплификационную смесь (по 45 мкл) в чистой от ДНК комнате. Образцы ДНК следует вносить в пробирки в отдельном помещении.

Микс на одну пробирку:

- 35 мкл PNM - поставляется в наборе;
- 5 мкл 10-кратного полимеразного буфера для инкубации;
- x мкл раствора MgCl₂;
- 1-2 единицы термостабильной ДНК-полимеразы;
- y мкл воды для доведения объема до 45 мкл (без учета объема фермента);
- добавить 5 мкл раствора ДНК (20-100 нг ДНК) для получения конечного объема 50 мкл (без учета объема фермента);
- В зависимости от используемой системы фермент/буфер, оптимальная концентрация MgCl₂ может варьировать между 1.5 и 2.5 мМ.
- Обратите внимание, что некоторые инкубационные буферы уже содержат MgCl₂.
- При испытательных изучениях наборов GenoType® Mycobacterium CM применялась HotStarTaq ДНК-полимераза от фирмы «Qiagen». При использовании этого фермента, на один образец необходимы следующие количества:
 - 35 мкл PNM
 - 5 мкл 10-кратного ПЦР буфера для HotStarTaq (содержит 15 мМ MgCl₂)
 - 2 мкл 25мМ раствора MgCl₂
 - 0.2 мкл (1 ед) HotStarTaq
 - 3 мкл воды (для молекулярно-биологических исследований)
 - 5 мкл раствора ДНК (вносить в отдельной чистой зоне)

Конечная концентрация MgCl₂ в этой амплификационной смеси составляет 2,5 мМ.

Определите количество образцов для амплификации (количество анализируемых проб + контрольные образцы). Проба контроля контаминации, например, содержит 5 мкл воды вместо раствора ДНК. Подготовить мастер-микс, содержащий все реактивы, за исключением раствора ДНК, и хорошо перемешать (не на

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 с соответствующим буфером (CON-C с CON-D, SUB-C с SUB.D) в необходимом количестве. Хорошо перемешайте и доведите до комнатной температуры. Из расчёта 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 6 мин при комнатной температуре.
3. В это время пинцетом выньте стрипы из тубы и подпишите их карандашом под цветной полосой. Со стрипами работать только в перчатках.
4. Осторожно добавьте в каждую ячейку 1 мл предварительно нагретого гибридационного буфера (НУВ, зеленого цвета). Аккуратно покачивайте ванночку до получения гомогенного окрашивания.
5. Следите, чтобы раствор не попал в соседние ячейки.
6. Поместите стрипы в ячейки.
7. Стрипы должны быть полностью погружены, а рабочая сторона (определяемая по цветной полосе на нижнем конце) должна быть лицом вверх. Если стрип перевернулся, его нужно поправить пинцетом. Во избежание контаминации тщательно мойте пинцет после каждого применения. Это важно и на всех последующих этапах тестов.
8. Поместите ванночку на водяную баню с шейкером/термошейкером и инкубируйте 30 мин при температуре 46°C.
9. Установите скорость встряхивания водяной бани так, чтобы жидкость постоянно перемешивалась, но не попадала в

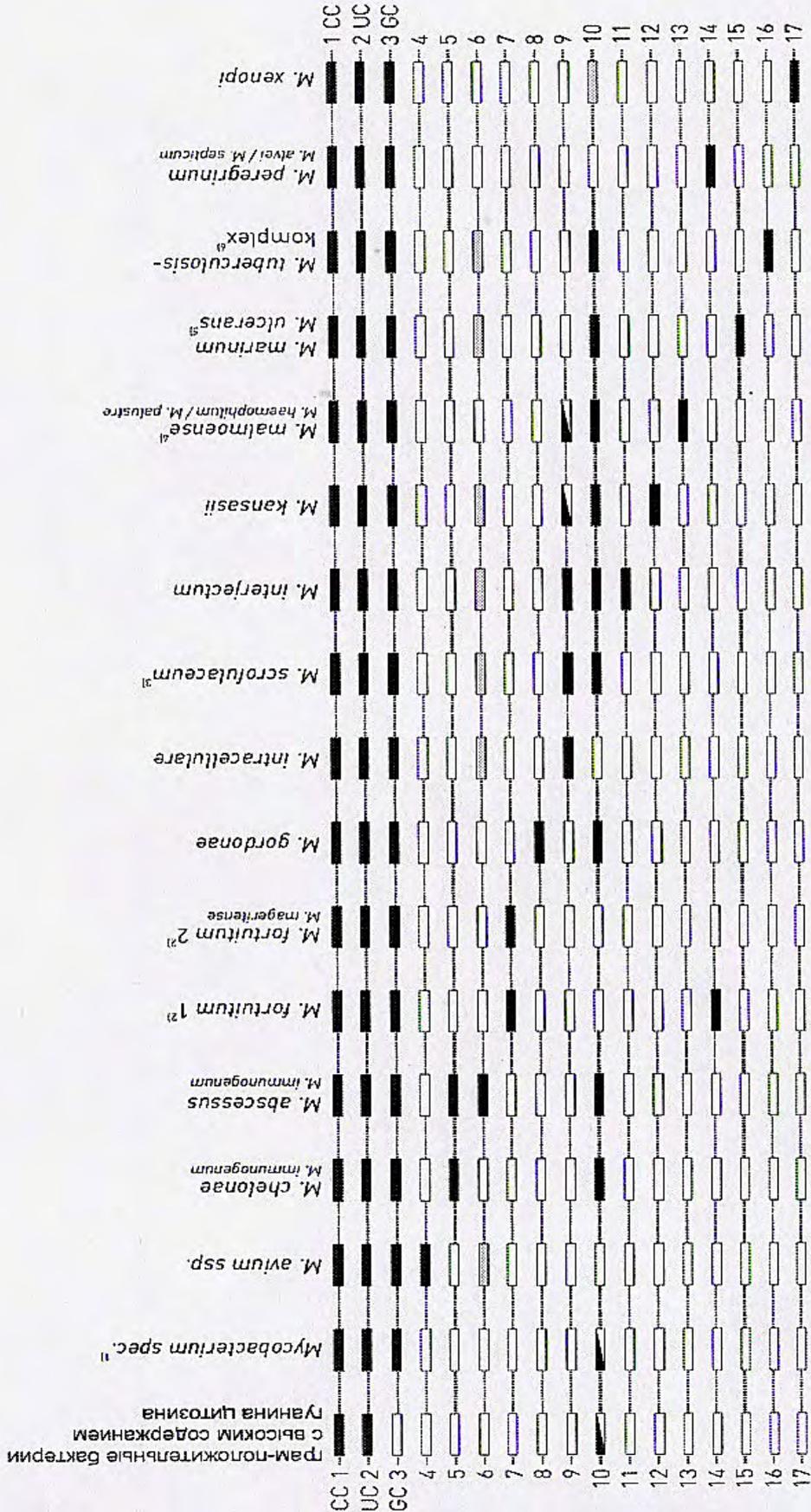
соседние ячейки. Чтобы установить равномерное распределение температуры, ванночку погружают на 1/3 высоты.

10. Полностью аспирируйте Гибридизационный Буфер. К примеру, можно использовать пастеровскую пипетку, соединенную с вакуумным насосом.
11. Добавьте 1 мл Раствора для жесткой промывки (STR, красного цвета) в каждый стрип и инкубируйте 15 мин при 46°C в водяной бане с шейкером/ Twincubator.
12. Далее работайте при комнатной температуре.
13. Полностью удалите раствор для жесткой промывки.
14. Вылейте моющий раствор в контейнер для отходов, а остатки жидкости удалите похлопыванием ванночки по фильтровальной бумаге. Таким же образом поступайте и при следующих этапах отмывки.
15. Отмойте каждый стрип в 1 мл промывающего Раствора (RIN) в течение 1 мин на платформе шейкера/ /термошейкера (слейте RIN после инкубации).
16. Добавьте по 1 мл разведенного Конъюгата (см. выше) в каждый стрип и инкубируйте 30 мин на платформе шейкера /термошейкера.
17. 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//термошейка. После последней промывки тщательно удалите все остатки воды.
18. Добавьте 1 мл разведенного субстрата в каждый стрип и инкубируйте без встряхивания, защищая от света.
19. В зависимости от условий теста (например, температуры в комнате), время субстратной инкубации может варьировать от 3 до 20 мин. Слишком длительная инкубация может привести к избыточному развитию окраски фона, и, тем самым может способствовать неправильной интерпретации результатов.
20. Остановите реакцию быстрым двукратным промыванием дистиллированной водой.
21. 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 УС 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 УС. На каждом стрипе всего 27 зон реакции (см. рис.29).

грам-положительные бактерии
с высоким содержанием
гуанина цитозина



■ окрашивание ■ случайное слабое окрашивание □ нет окрашивания

Рисунок 29 - Стрип

Обратите внимание: стрип изображен в натуральную величину.

Контроль конъюгата (CC)

Линия в этой зоне должна быть хорошо проявлена, подтверждая эффективность связывания конъюгата и правильность субстратной реакции

Универсальный Контроль (UC)

Эта зона улавливает все известные микобактерии и представителей группы грамположительных бактерий с высоким содержанием гуанина и цитозина. Если эта зона и зона Контроля Конъюгата становятся положительными, а остальные полоски не указывают на специфическую микобактерию, для идентификации соответствующего вида бактерии нужны дополнительные методы.

Учитываются только те полоски, интенсивность которых такая же или же более, чем у зоны Универсального Контроля.

Контроль Рода (CG)

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

Полоска Контроля Рода может выпасть, несмотря на присутствие микобактериальной ДНК; если специфическая полоска присутствует, реакция амплификации проведена правильно, результат теста действителен.

Если нет видоспецифичных полосок, область показывает присутствие грамположительных бактерий с высоким содержанием гуанина и цитозина, в редких случаях происходящих от микобактерий, которые нельзя определить этим набором.

Пожалуйста, обратите внимание, что дополнительные виды микобактерий можно идентифицировать при помощи набора GenoType®*Mycobacterium* AS.

Другие полоски:

Специфические пробы для оценки смотрите в таблице интерпретации.

Не все полоски на стрипе могут показывать одинаковую силу сигнала.

Если добавить слишком большое количество ампликонов, можно получить дополнительные полосы (См. главу Решение проблем).

Полоска N1 (CC): Контроль Конъюгата

Полоска N2 (UC): Универсальный Контроль

Полоска N3 (GC): Контроль Рода

1) Виды в дальнейшем возможно дифференцировать набором **GenoType®Mycobacterium AS**.

2) На основе различий в зонде. *M. Fortuitum* подразделяется на 2 группы:

3) *M. "paraffinicum"* и *M. parascrofulaceum* показывают те же полоски, что *M. scrofulaceum*.

4) *M. haemophilium*, можно определить набором **GenoType®Mycobacterium AS**.

5) *M. ulcerans* можно определить набором **GenoType®Mycobacterium AS**.

6) Для дальнейшей дифференциации используется набор **GenoType® MTBC**.

Ограничения метода

- Данным методом нельзя дифференцировать виды, входящие в комплекс *M. tuberculosis*.
- Перед амплификацией нужно выделить ДНК из бактериальной культуры с помощью подходящего метода. Необходимо удостовериться в том, что исходная ДНК успешно амплифицировалась во время амплификации.
- Данный тест работает только в пределах участка генома, из которого были выбраны праймеры и зонды. Для анализа последовательности необходимы дальнейшие исследования. Наличие 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 зонды, 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. Данный тест отражает знания, накопленные на сегодняшний день компанией Hain Lifescience.

- Этот тест может проводиться только обученным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами исследования.
- Оценка этой тест-системы была проведена с помощью HotStartTaq полимеразы фирмы «Qiagen», Германия. Поскольку технические характеристики данного теста были валидированы не для всех коммерчески доступных полимераз, то конечный пользователь сам несёт ответственность за возможность применения полимераз, отличных от выше перечисленных.

Подробную информацию об этом тесте можно запросить на сайте: www.hain-lifescience.com.

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 введен CON-C и/или SUB-C.

Слабые сигналы или их отсутствие за исключением зоны Контроля Конъюгата

- Количество и/или качество выделенной ДНК не позволило пройти реакции амплификации. Проверьте ампликоны в 2% агарозном геле. В случае отсутствия ампликонов, повторите выделение ДНК и амплификацию. При необходимости попробуйте другой метод выделения ДНК (см. главу выделение ДНК).
- Температура инкубации слишком высокая.
- Выделенный бактериальный материал не определяется Универсальным Контролем и Контролем Рода.

Негомогенное окрашивание

Стрипы были не полностью погружены. Ванночка недостаточно встряхивалась.

Сильное фоновое окрашивание

- Использовались слишком концентрированные растворы CON-C и/или SUB-C Недостаточно промыты стрипы
- Отмывающие растворы слишком холодные

Неожиданный результат

- Неверная температура инкубации.
- Гибридизационный Буфер и/или Раствор для Жесткой Промывки недостаточно нагреты или перемешаны.
- Контаминация выделенной ДНК и/или агентов амплификации выделенной и/или амплифицированной ДНК. В случае контаминации агентов амплификации, отрицательный контроль тоже окрашивается.
- Контаминация соседних ячеек во время добавления Гибридизационного Буфера.
- 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 перекрестно-гибридизированных полос.
- Исходный материал не является чистой культурой.
- В образце присутствуют бактерии, которые не могут быть обнаружены данным тестом [8,14].

Необходимые, но не поставляемые материалы

- Фильтровальная бумага
- Микропипетки на 10, 20, 200 и 1000 мкл
- Откалиброванный термометр
- Одноразовые перчатки
- Одноразовые стерильные наконечники с фильтром

- Мерный цилиндр
- ПЦР-пробирки без ДНКазы и РНКазы
- Водяная баня с шейкером TwinCubator
- Горизонтальная платформа с шейкером TwinCubator
- Термоциклер (нагрев: $30^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, охлаждение: $2^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, точность: $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$)
- Таймер
- Пинцет
- Вода для молекулярно-биологических исследований
- Водяная баня
- Термостабильная ДНК-полимераза с буфером (рекомендовано: hot start-полимераза, разрешение: 2-4 кб/мин при 72°C , срок полужизни: 10 мин при 97°C , 60 мин при 94°C , эффективность амплификации: >105 раз)
- Реактивы для выделения ДНК и необходимое для амплификации оборудование
- Ультразвуковая баня [8,14].

3.4. GenoType® MTBDRsl

GenoType® MTBDRsl молекулярно-генетическое исследование для выявления устойчивости комплекса *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам, аминогликозидам/циклическим пептидам и этамбутолу

Методология

Тест **GenoType® MTBDRsl** основан на DNA-STRIP-технологии и позволяет проведение молекулярно-генетической идентификации комплекса *Mycobacterium tuberculosis* и его устойчивости к фторхинолонам, (напр. офлоксацин и моксифлоксацин) и/или аминогликозидам/ циклическим пептидам (инъекционные антибиотики, такие как капреомицин, виомицин/канамицин, амикацин) и этамбутолу. При резистентности к фторхинолонам возможна детекция наиболее значительных мутаций в гене *gyrA* (кодирующим ДНКгиразу). Для выявления устойчивости к аминогликозидам/циклическим пептидам исследуется ген *16S rRNA (grs)* и для выявления устойчивости к этамбутолу ген *embB* соответственно (эти гены вместе с генами *embA* и *embC* кодируют арабинозил трансферазу).

Процедура проведения теста подразделяется на три этапа: выделение ДНК из культивированного материала (плотная/жидкая среда) или из клинических образцов (отделяемое легких, деконтаминированные положительные образцы мокроты) - необходимые реагенты не поставляются, мультиплексная амплификация с биотинилизированными праймерами (необходимая термостабильная ДНК полимераза не поставляется), реверс-гибридизация.

Гибридизация включает следующие этапы: химическую денатурацию продуктов амплификации, гибридизацию одноцепочечных ампликонов, меченых биотином, на мембранасвязанных зондах, тщательную отмывку, добавление конъюгата, стрептовидин/щелочной фосфатазы (AP) и опосредованную щелочной фосфатазой, реакцию окрашивания. Простая и быстрая оценка полученных результатов проводится с помощью прилагаемого шаблона.

Хранение и меры предосторожности

Смесь праймеров/нуклеотидов (PNM) следует хранить при 2-8°C. строго изолировано от потенциальных источников контаминации ДНК, если необходимо более длительное хранение (более 4-х недель), поместите их в холодильник при температурном режиме - 20°C. Чтобы избежать повторных замораживаний и оттаиваний, рекомендуется аликвотировать PNM. Все остальные компоненты набора хранить при 2-8°C. После окончания срока реактивы не использовать.

Образцы от пациентов и культуры, полученные из образцов пациентов, всегда должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Образцы от пациентов из группы риска и культуры, полученные из этих образцов, всегда должны быть промаркированы, и работать с ними необходимо, соблюдая все меры предосторожности. Всегда необходимо использовать защитную одежду и перчатки. Обработку образцов и пробоподготовку, включая инактивацию при высокой температуре, надо проводить в ламинарном боксе II класса. Перед инактивацией при высокой температуре, пробы нужно центрифугировать с применением аэрозоль-непроницаемого ротора. Аэрозоль-непроницаемый ротор можно открывать исключительно в ламинарном боксе. После инактивации при высокой температуре может быть применен стандартный ротор для центрифугирования проб вне ламинарного бокса.

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.

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

Денатурирующий Раствор (DEN) содержит <2% NaOH и действует раздражающе на глаза и кожу .

Концентрат Субстрата (SUB-C) содержит диметилсульфоксид, который является сильным раздражителем (R 36/37/38, S 23-26-36). Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Контроль качества

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

- Зона Контроля Конъюгата для проверки связывания конъюгата со стрипом и правильного выполнения хромогенной реакции.
- Зона Контроля Амплификации, которая показывает успешное проведение амплификации.
- Три зоны Контроля локусов (*gyrA*, *rrs* и *embB*), контролирующей оптимальную чувствительность реакции для каждого тестируемого локуса.

Выделение ДНК

Исходным материалом для теста могут быть бактерии, выросшие на плотной среде (Левенштейна-Йенсена), или на жидкой (например на Бактеке) среде, а так же можно использовать клинические образцы положительной мокроты (лёгочных проб). Тест не подходит для детекции микобактерий в клинических отрицательных образцах мокроты. Рабочая площадь должна быть чистой от амплифицированной ДНК. Решающим моментом является нагревание образцов до 95°C в течение 20 минут, чтобы обеспечить полный лизис клеток и инактивировать вегетативные бактерии. Можно применять любые методы выделения ДНК, позволяющие получить амплифицируемую ДНК из бактерий. Следующий краткий протокол позволяет получить ДНК, подходящую для амплификации:

1. При работе с бактериями, выращенными на плотной среде, петлей отобрать бактерии и суспендировать в примерно 300 мкл воды (вода должна быть пригодна для молекулярно-биологических исследований).
2. При работе с бактериями, выросшими на жидкой среде, в работу берётся 1 мл. При использовании клинических образцов, берётся 500 мкл деконтаминированного образца. Бактерии осаждают при центрифугировании в течение 15

мин при 10000g в стандартной настольной центрифуге с аэрозоль-непроницаемым ротором в ламинарном боксе II класса.

3. Супернатант сливают, а бактерии ресуспендируют на вортексе в 100-300 мкл воды или в 100 мкл воды (для клинических образцов).
4. Инкубируют бактерии из пп. 1 и 2 на водяной бане 20 минут при 95°C.
5. Обрабатывают пробу в ультразвуковой бане в течение 15 мин (для культуральных образцов этот этап - по усмотрению).
6. Центрифугируют пробу на максимальной скорости 5 мин, и используют 5 мкл супернатанта для ПЦР. Если предполагается более длительное хранение, то раствор ДНК необходимо перенести в новую пробирку.

Детальные протоколы можно получить у Вашего дистрибьютора или на сайте: www.hain-lifescience.com.

Амплификация

Подготовить амплификационную смесь (по 45 мкл) в чистой от ДНК комнате. Образцы ДНК следует вносить в пробирки в отдельном помещении.

Микс на одну пробирку:

35 мкл PNM

5 мкл 10-кратного полимеразного буфера для инкубации

x мкл раствора MgCl₂)

1-2 единицы термостабильной ДНК-полимеразы (см. данные изготовителя)

у мкл воды для доведения объема до 45 мкл (без учета объема фермента)

Добавить 5 мкл раствора ДНК (20-100 нг ДНК) для получения конечного объема 50 мкл (без учета объема фермента)

1) В зависимости от используемой системы фермент/буфер, оптимальная концентрация MgCl₂ может варьировать между 1,5 и 2,5 mM.

Обратите внимание, что некоторые инкубационные буферы уже содержат MgCl₂.

При испытательных изучениях наборов GenoType®*Mycobacterium* SM применялась HotStarTaq ДНК- полимераза от Qiagen. При использовании этого фермента, на один образец необходимы следующие количества:

- 35 мкл PNM
- 5 мкл 10-кратного ПЦР буфера для HotStarTaq (содержит 15 мМ MgCl₂)
- 2 мкл 25мМ раствора MgCl₂
- 0,2 мкл (1 Ед) HotStarTaq
- 3 мкл воды (для молекулярно-биологических исследований)
- 5 мкл раствора ДНК (вносить в отдельной чистой зоне)

Конечная концентрация MgCl₂ в этой амплификационной смеси составляет 2,5 мМ.

Определите количество образцов для амплификации (количество анализируемых проб + контрольные образцы). Проба контроля контаминации, например, содержит 5 мкл воды вместо раствора ДНК. Подготовьте мастер-микс, содержащий все реактивы, за исключением раствора ДНК, и хорошо перемешать (не на вортексе). Аликвотировать по 45 мкл в каждую подготовленную ПЦР-пробирку.

	Культуральные образцы	Клинические образцы
15 мин. 95 ⁰ С	1 цикл	1 цикл
30 сек. 95 ⁰ С } 2 мин. 58 ⁰ С }	10 циклов	10 циклов
25 сек. 95 ⁰ С } 40 сек. 53 ⁰ С }	20 циклов	30 циклов
40 сек. 70 ⁰ С		
8 мин 70 ⁰ С	1 цикл	1 цикл

Относительно Taq полимеразы, использованной для валидации: если применяется определенная hot start ДНК-полимераза, время, необходимое для первого этапа нужно сократить (см. указания производителя фермента).

Продукты амплификации могут храниться при температуре от +4°C до -20°C.

Для проверки реакции амплификации, можно нанести 5 мкл каждого образца прямо на 2% агарозный гель без добавления буфера. Длина ампликонов составляет примерно 230 пар оснований (Контроль Рода) и до 200 пар оснований (Универсальный Контроль /видоспецифичный фрагмент) соответственно.

Гибридизация

Подготовка

Предварительно прогреть водяную баню с шейкером или термшейкером до 45°C. Максимально допустимое отклонение температуры $\pm 1^\circ\text{C}$. Растворы НУВ и STR 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 Коньюгата (CON-C - оранжевый) и Концентрат Субстрата (SUB-C - желтый) в соотношении 1:100 с соответствующим буфером (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 6 мин при комнатной температуре. В это время пинцетом выньте стрипы

из тубы и подпишите их карандашом под цветной полосой. Со стрипами работать только в перчатках.

3. Осторожно добавьте в каждую ячейку 1 мл предварительно нагретого гибридационного буфера (НУВ, 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, а рабочая сторона (определяемая по цветной полосе на нижнем конце) должна быть лицом вверх. Если стрип перевернулся, его нужно поправить пинцетом. Во избежание контаминации тщательно мойте пинцет после каждого применения. Это важно и на всех последующих этапах тестов.
5. Поместите ванночку на водяную баню с шейкером/термошейкером и инкубируйте 30 мин при температуре 46°C. Установите скорость встряхивания водяной бани так, чтобы жидкость постоянно перемешивалась, но не попадала в соседние ячейки. Чтобы установить равномерное распределение температуры, ванночку погружают на 1/3 высоты.
6. Полностью аспирируйте Гибридационный Буфер. К примеру, можно использовать пастеровскую пипетку, соединенную с вакуумным насосом.
7. Добавьте 1 мл раствора для жесткой промывки (STR, красного цвета) в каждый стрип и инкубируйте 15 мин при 46°C в водяной бане с шейкером/термошейкером.
8. Далее работайте при комнатной температуре. Полностью удалите раствор для жесткой промывки. Вылейте 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/ термошейкером. После последней промывки тщательно удалите все остатки воды.
12. Добавьте 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 субстратной инкубации может варьировать от 3 до 20 мин. Слишком длительная инкубация может привести к избыточному развитию окраски фона, и, тем самым может способствовать неправильной интерпретации результатов.
 13. 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 УС 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 УС. На каждом стрипе всего 27 зон реакции:



Рисунок 30. Оценка результатов теста GenoType® MTBDRsl

Контроль конъюгата (CC)

Линия в этой зоне должна быть хорошо проявлена, подтверждая эффективность связывания конъюгата и правильность субстратной реакции

Зона контроля амплификации (AC)

Если тест выполнен правильно, контроль ампликонов свяжется с зоной контроля амплификации на стрипе. Следовательно, если эта полоска развилась, то можно исключить, ошибки при выделении ДНК и амплификации и присутствие ингибиторов амплификации в образце могут быть также исключено.

В случае положительного результата тестирования, сигнал в зоне контроля амплификации (АС) может быть слабым или даже невидимым, это может быть вызвано конкурентными реакциями в процессе амплификации.

Тем не менее, в этом случае, реакция амплификации не требует повторения и считается успешной. Если же результат отрицательный или отсутствует полоска АС, то это указывает на ошибку во время проведения амплификации, либо влияние ингибиторов. В этом случае исследование надо повторить.

Комплекс *M. tuberculosis* (TUB)

Эта зона реакции гибридизируется с ампликонами, полученными от всех представителей комплекса *Mycobacterium tuberculosis*. Если зона TUB отрицательная, это означает, что выделенные бактерии не принадлежат к комплексу *M. tuberculosis* и не могут быть диагностированы данной тест- системой.

Контроли локусов (*gyrA*, *rrs. embB*)

Зона Локус Контроля детектирует регион гена, специфичного для соответствующего локуса и должна всегда окрашиваться положительно. Если нет развития ни в одном из трех тестируемых генов - ни в пробе Локус Контроля, ни в пробах дикого типа, ни в мутантных пробах, результаты тестирования нельзя учитывать.

Пробы дикого типа

Пробы дикого типа охватывают важнейшие участки устойчивости каждого гена (см. рис. 1, так же таб. 1,2, и 3). Если все пробы дикого типа одного гена показывают положительный сигнал, значит не зафиксировано ни одной мутации в нуклеотидной последовательности. Следовательно, штамм чувствителен к соответствующим антибиотикам. В случае мутации, определенные 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. Во внимание должны приниматься только полоски с интенсивностью, равносильной или большей, чем полоска Контроля амплификации (АС) [8,14, 15].

Каждый образец полоски, отличный от образца полоски дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма. Полоска, полученная в пробе *gyrA* приводит к выводу об устойчивости к фторхинолонам (напр. офлоксацину или моксифлоксацину), полоска, полученная в пробе- *rrs* - об устойчивости к аминогликозидам (напр., капреомицину или виомицину); циклическим пептидам и полоска в пробе *embB* свидетельствует об устойчивости тестируемых штаммов к этамбутолу.

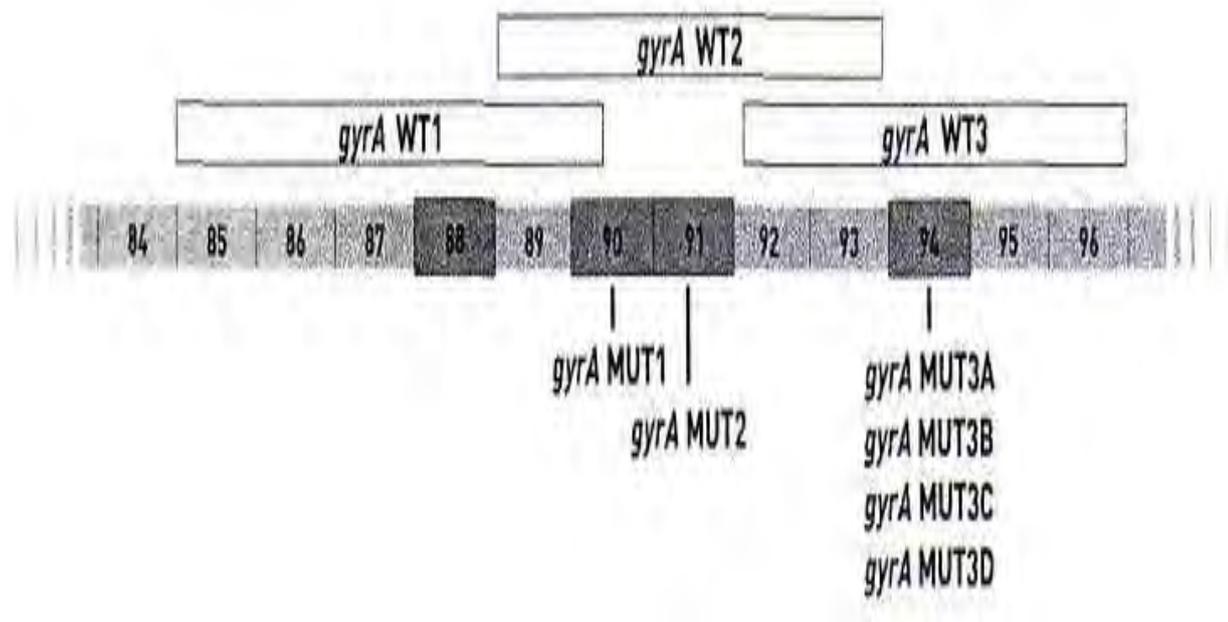


Рисунок 31. Области устойчивости к фторхинолонам в гене *gyrA*

Мутантные пробы

Мутантные пробы выявляют наиболее часто встречаемые мутации, вызывающие устойчивость (см. табл. 1, 2). Только полоски с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Контроля Амплификации (АС), могут приниматься во внимание. Каждая полоса, отличающаяся от полосок дикого типа, указывает на устойчивость тестируемого штамма. Полоска, полученная в пробе *gyrA*, позволяет сделать вывод об устойчивости к фторхинолонам, например, к офлоксацину или моксифлоксацину; полоска, развившаяся с пробой *rrs*, говорит об устойчивости к аминогликозидам, например,

капреомицину, канамицину или амикацину; и полоски, полученные в пробах embB - свидетельствуют об устойчивости тестируемых штаммов к этамбутолу.

Обратите внимание на следующие особые случаи:

1. Есть 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 немутантных последовательностей в данном исследовании.
2. Возможны ситуации, когда, исследуемый материал одновременно содержит несколько штаммов комплекса *M. tuberculosis* (смешанная культура или контаминация). Если хотя бы один из штаммов содержит мутацию, то может положительно окраситься полоска, как в мутантной пробе, так и в соответствующей пробе дикого типа. Будет ли соответствующая резистентность фенотипически обусловленной, зависит от соотношения устойчивых и чувствительных штаммов в данном исследовании.

Таблица 1. Мутации в гене *gyrA* и соответствующие дикие типы и мутантные пробы.

Слабые пробы дикого типа	Исследованные кодоны	Мутантные пробы	Мутации	Фенотипическая устойчивость
<i>gyrA</i> WT1	85-90		C88S	FLQ
<i>gyrA</i> WT1	85-90		A88T	FLQ
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	FLQ
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	FLQ
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT 3A	D94A	FLQ

gyrA WT3	92-97	gyrA MUT3B	D94N	FLQ
gyrA WT3	92-97	gyrA MUT3B	D94Y	FLQ
gyrA WT3	92-97	gyrA MUT3C	D94G	FLQ
gyrA WT3	92-97	gyrA MUT3D	D94H	FLQ

1. FLQ: фторхинолоны (офлоксацин или моксифлоксацин)
2. R= устойчивость
3. Эта редкая мутация была выявлена пока только теоретически и вполне возможно, что эту мутацию нельзя определить *in vitro*.

Таблица 2 Мутации в гене embB соответствующие дикие типы и мутантные пробы.

Слабые пробы дикого типа	Исследованные кодоны	Мутантные Пробы	Мутации	Фенотипическая устойчивость
embB WT	306	embB MUT1A	M3061	EMB
embB WT	306	embB MUT1B	M306V	EMB
embB WT	306		M3061	EMB
embB WT	306		M3061	EMB

embB: этамбутол, R – устойчивость

M3061: замена основания на кодоне 306: ATG↓ATC

M3061: замена основания на кодоне 306: ATG↓ATA

M3061: замена основания на кодоне 306: ATG↓ATT

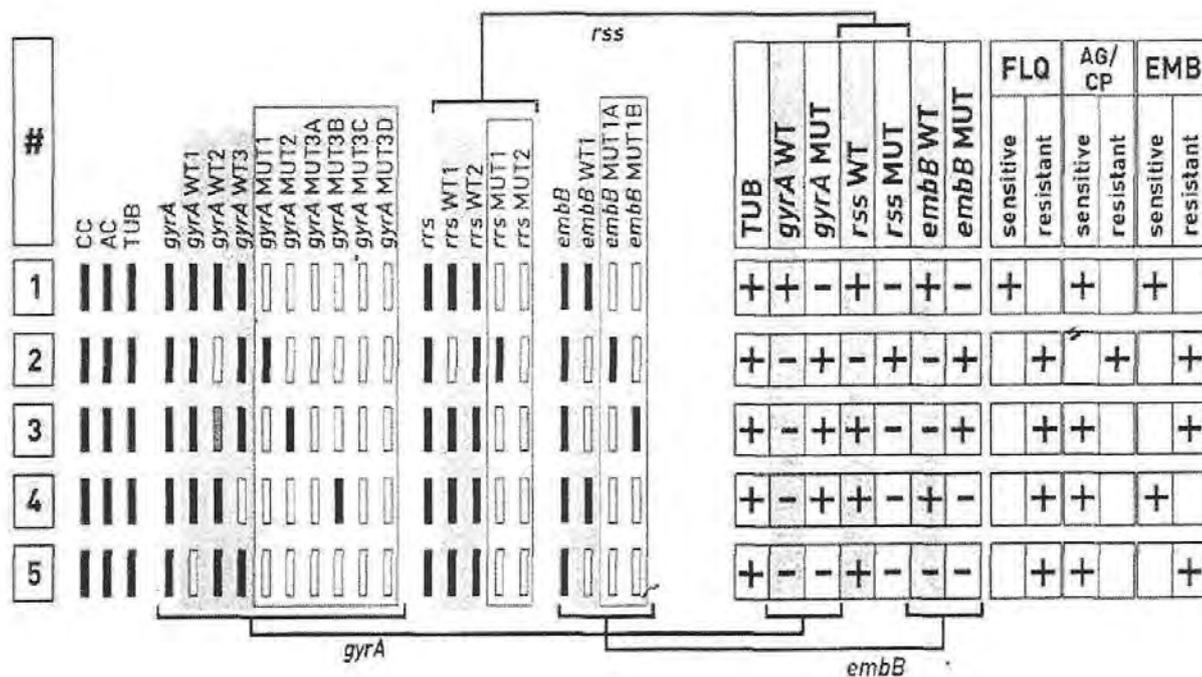


Рисунок 32. Примеры интерпретации результатов GenoType® MTBDRsl

Примеры интерпретации результатов

Примеры образцовых полосок и их интерпретации относительно устойчивости к фторхинолонам и/или аминогликозидам/циклическим пептидам и/или этамбутолу.

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 соответствующего 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 соответствующего гена обозначается, как "+",

Ограничения метода

Как и для других диагностических тестов, результаты должны интерпретироваться совместно с результатами других лабораторных тестов и клинических данных, доступных для лечащего врача. Этот тест может проводиться только обученным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами исследования.

Основные положения, описанные в этой инструкции касательно возможности методики, относятся к культуральным образцам и положительным образцам мокроты. Доступных на сегодняшний день данных по внелегочным положительным клиническим образцам мокроты недостаточно, для того, чтобы сделать вывод об уместности их применения. Наличие нескольких видов бактерий в анализируемом образце может помешать правильной интерпретации теста. Перед проведением амплификации необходимо выделить ДНК из бактериальных культур или клинических положительных образцов мокроты, применяя подходящую методику. Необходимо удостовериться в том, что исходная ДНК успешно амплифицировалась во время амплификации.

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, не приводящие к замене аминокислот (молчащие мутации), тем не менее ведут к отсутствию одной из проб дикого типа.

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

Тест GenoType® MTBDRsl улавливает только устойчивость комплекса *M. tuberculosis* с происхождением в областях исследуемых генов: gyrA, rrs., embB. Устойчивости, обусловленные мутациями других генов или областей генов, так

же как и другие механизмы устойчивости к фторхинолонам, аминогликозидам/циклическим пептидам, этим тестом определить нельзя.

Пожалуйста, обратите внимание, что эффекты, вызванные множественными мутациями за пределами изучаемых последовательностей, не могут быть выявлены данным тестом. 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. Данный тест отражает знания, накопленные на сегодняшний день компанией HainLifescience.¹ [8,14, 15].

¹ Подробную информацию об этом тесте можно запросить на сайте: [www: hain-lifescience.com](http://www.hain-lifescience.com)

3.5. GeneXpertMTB/RIF

GeneXpert MTB/RIF полностью автоматизированная система, проводящая ПЦР в реальном времени, которая определяет ДНК MTB комплекса из образцов мокроты, как с положительным, так и с отрицательным результатом микроскопии. Одновременно определяется мутация гена в кодоне *groV*, ассоциированного с резистентностью к рифампицину [16].

Система GeneXpert MTB/RIF включает в себя компьютер, сканер для считывания штриха и простых в использовании, одноразовых картриджей, содержащих в себе реагент для проведения исследований.

После 3-ступенчатой подготовки в лаборатории, образец помещается в картридж GeneXpertMTB/RIF и помещается в аппарат GeneXpert. С начала тестирования система GeneXpert MTB/RIF автоматически проводит последующие шаги, включая амплификацию нуклеиновых кислот, выявление объекта секвенирования и интерпретацию результата.

Праймеры в тесте GeneXpert MTB/RIF амплифицируют участок *groV* гена, содержащий «сердцевинный» («коровый») регион с 81 парами оснований. Зонды способны дифференцировать сохраненные «дикие» последовательности и мутации в «коровом» регионе, которые ассоциированы с резистентностью к рифампицину. Кроме того, анализ включает в себя контроль обработки образцов (SPC) для проверки адекватности обработки целевых бактерий и выявления присутствия ингибитора (ов) ПЦР-реакции. Контроль проверки зонда (PCC) определяет регидратацию реагента, заполнение ПЦР пробирок в картридже, целостность зонда и стабильность красителя [17].

Образцы

Примечание: Каждый доставленный образец должен быть правильно промаркирован, как минимум универсальным идентификационным номером. Этот номер должен также быть указан в лабораторной форме и в лабораторном журнале.

Тип образца

- В зависимости от вида биологического материала собирается его адекватный объем
- Собрать как минимум 1мл мокроты. Образец не должен содержать кусочки пищи или другие плотные включения.
- GeneXpert MTB/RIF валидирован только для мокроты и концентрированных образцов мокроты. Другие образцы не могут быть использованы.
- **Хранение образцов**
- Образцы должны храниться по мере возможности при температуре 2–8°C до начала исследования. Если не возможно сразу же провести исследования, то образец может храниться при температуре 35°C максимум 3 дня, при температуре 4°C 4-10 дней.

Оборудование и материалы

Набор Xpert MTB/RIF, содержит

- МТВ/RIF картриджи (10 х)
- Стерильные одноразовые пипетки (12х)
- Реагент для образцов (10 х 8 мл флаконы)

Необходимые материалы, но не поставляемые вместе с наборами

- Стерильные контейнеры для сбора мокроты с закручивающимися крышками.
- Одноразовые перчатки
- БШБ или респираторы N95
- Пластиковый бак для отходов
- Таймер
- Раствор дезинфектанта
- Этикетки и/или перманентный маркер
- Дополнительно: стерильные пипетки

Хранение и использование оборудования и материалов

Картриджи для GeneXpert MTB/RIF реагенты должны храниться при температуре 2–28 С.

- Не использовать реагенты и картриджи после истечения срока годности.
- Картриджи сохраняют свои стабильные свойства до 7 дней после открытия упаковки.

Детальные инструкции

Запуск аппарата GeneXpert MTB/RIF

Примечание: До начала исследования образца, убедитесь, что аппарат и модули в рабочем состоянии.

1. Включите компьютерную программу аппарата GeneXpert Dx.
2. На рабочем столе Windows дважды кликните на ярлыке GeneXpert Dx.
3. Введите имя пользователя и пароль для системы GeneXpert Dx
4. Кликните на “CHECK STATUS (проверка статуса) ” и проверьте доступности модулей. Если нет, то обратитесь в раздел “Troubleshooting” (поиск неисправностей) в Руководстве пользователя.

Обработка образцов

1. Продезинфицируйте рабочую область.
2. Промаркируйте каждый картридж Xpert MTB/RIF в соответствии с маркировкой образца. Не наносить маркировку на крышку картриджа и поверх 2D штриха картриджа. Надписывайте или прикрепите этикетку по бокам картриджа.
3. добавьте Реагент для образца в соотношении 2:1 к образцу мокроты или 3:1 (v/v) к деконтаминированному осадку и снова закройте контейнер.
4. Тщательно взболтайте 10-20 раз.
5. Оставьте для инкубации на 5 минут при комнатной температуре.
6. Снова тщательно перемешайте 10 – 20 раз.

7. Продолжайте инкубацию еще 10 минут.

Подготовка картриджа

Примечание: Начинайте тестирование в течение 30 минут с момента добавления образца в картридж.

Используйте стерильные пипетки для переноса разжиженного аспирата образца. Набирайте аспират в пипетку, до тех пор, пока мениск не будет выше маркировки (= 2мл).

Откройте крышку картриджа.

Перенесите образец в открытый порт картриджа Xpert MTB/RIF (рис. 33).

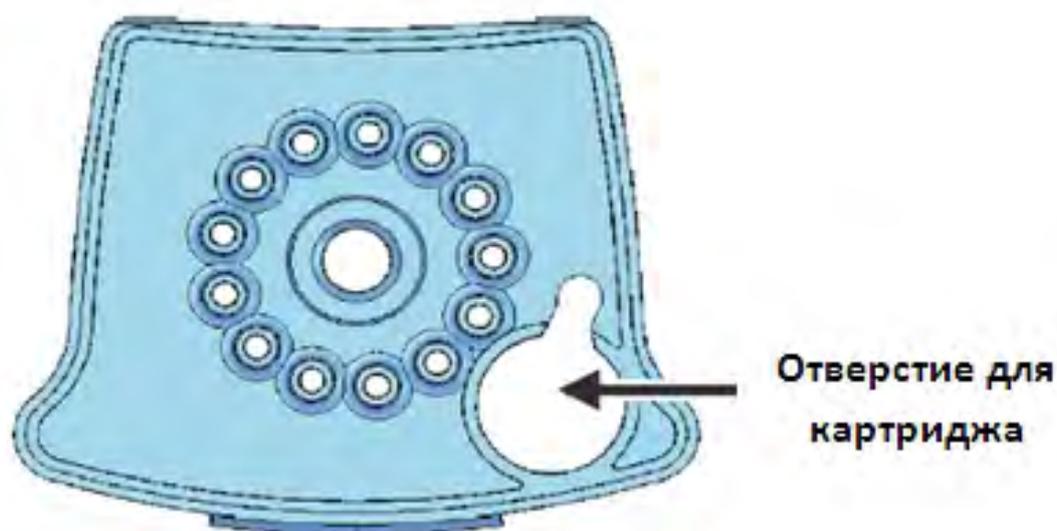


Рисунок 33. Картридж GeneXpert MTB/RIF

1. Вносите медленно, для уменьшения риска образования аэрозоля.
2. Убедитесь, что крышка плотно встала на место.

Примечание: Помните, разжиженный образец может храниться до 12 часов при температуре 2-8 С для повторного теста (при необходимости).

Начало тестирования на аппарате GeneXpert :

1. В окошке GeneXpert Dx System кликните “CREATE TEST (создать тест)”. Появится диалоговое окошко «Scan Cartridge Barcode (отсканировать штрих картриджа)».

2. Отсканируйте штрих на картридже Xpert MTB/RIF.
3. Появится окно создания теста.
4. Используя данные штрихкода, программа автоматически заполнит боксы соответствующих полей: выбор пробирки, лот реагента, SN картриджа, срок годности.
5. В поле «сканирование образца» отсканируйте или напечатайте идентификационный номер образца. Убедитесь, что правильно напечатали идентификационный номер. Этот номер ассоциируется с результатом теста и показывается в окошке «View Results (посмотреть результаты)» и во всех отчетах.
6. Кликнуть “Start Test (начало тестирования)”.
7. В диалоговом боксе появится, напечатать ваш пароль.
8. Откройте дверцу модуля с горящим зеленым светом и загрузите картридж
9. Закройте дверцу.
10. Тестирование начнется и зеленый огонек перестанет мигать.
11. Когда тестирование закончится, огонек потухнет.
12. Подождите, пока система в конце исследования освободит замок и откроет дверцу модуля, чтобы освободить картридж.
13. Поместите использованный картридж в соответствующий контейнер для утилизации отходов в соответствии с вашими стандартными операционными процедурами.

Учет, регистрация и отчетность

Просмотр результатов на программном обеспечении GeneXpert
(Основные настройки пользователя)

В системе GeneXpert Dx кликните в меню «VIEW RESULTS
(просмотр результатов)». Появится окошко результатов.

1. Если в программном обеспечении появляется “Error (ошибка)”, “Invalid (не правильная)” или “No result (нет результата)”, повторите тест, используя готовый образец и новый картридж.
2. Если тест вновь показывает “Error (ошибка)”, “Invalid (не правильная)” или “No result (нет результата)”, обратитесь к разделу «Troubleshooting (устранение причин)» руководства

пользователя для устранения проблем до запроса нового образца.

Отчетность

Примечание: результат должен быть отмечен в специальном журнале регистрации ТБ лабораторного исследования. Используйте красный маркер для отметки положительных результатов. Отчет должен быть отправлен как можно быстрее.

- Отчет “MTB not detected (MTB не обнаружен)” или “MTB detected (MTB обнаружен)”.
- Отчет по резистентности к рифампицину выглядит следующим образом “Rif resistance not detected (резистентность к рифампицину не обнаружена)” или “Rif resistance detected (резистентность к рифампицину обнаружена)”.
- Если система при повторном исследовании не смогла дать результат, и вы не обнаружили или не зафиксировали технические проблемы, будет выдан ответ “Please submit a new specimen (пожалуйста, пришлите новый образец)”.

Утилизация отходов

- В конце каждого дня контаминированный материал (использованные контейнеры, пипетки, картриджи) поместить в сумку (пакет) и уничтожить как можно скорее.
- Держите сумку (пакет) в закрытой безопасной емкости или ведре до уничтожения. В промежуточной или центральной лаборатории, при наличии автоклава, инфицированные отходы следует автоклавировать до уничтожения.
- GeneXpert MTB/RIF полностью автоматизированная система, определяющая одновременно ДНК MTB комплекс из образцов мокроты, как с положительным, так и с отрицательным результатом микроскопии а также мутации гена в кодоне proV, ассоциированного с резистентностью к рифампицину и обладает высокой специфичностью и чувствительностью [16,19].

Заключение

В последние годы в связи с рекомендациями ВОЗ и GII, а также благодаря поддержке ряда международных организаций в Казахстане, поэтапно и успешно внедряются ускоренные методы диагностики МЛУТБ и ШЛУТБ:

GenoType® MTBDRplus (V1,V2), GeneXpert MTB/RIF; ШЛУТБ: GenoType® MTBDRsl. Подробная информация по этапам постановки вышеперечисленных тестов, критериев их оценки изложена в методических рекомендациях.

Целесообразность их применения в значительной степени обусловлена эпидемиологической ситуацией в стране, одной из характерных особенностей которой является увеличение числа форм туберкулеза с первичной и вторичной лекарственной устойчивостью. Внедрение новых методов позволило существенно сократить сроки получения результатов определения туберкулеза и лекарственной устойчивости к препаратам основного и резервного ряда, что имеет огромное значение, как для верификации диагноза, так и для назначения оптимальной схемы лечения. В частности, новые методы позволяют установить ТБ и МЛУТБ и ШЛУТБ менее чем за сутки, а классическое обследование – не ранее 75 дней.

Учитывая то, что эти методы являются для врачей бактериологов и фтизиатров новыми, в методических рекомендациях изложены все детали подготовки, постановки и интерпретации результатов молекулярно-генетических методов в строгом соответствии с международными стандартами.

Приложение 1. Требования к помещениям для проведения молекулярно-генетических исследований

Структура и оснащение бактериологической лаборатории для постановки «Хайн теста» ПЦР в соответствии с GLP

Для проведения ПЦР требуется не менее 3 отдельных помещений, а лучше 4 комнаты:

1. Комната для выделения ДНК
2. Комната для приготовления мастер-миксов
3. Комната для амплификации
4. Комната для гибридизации

Последние 2 процедуры можно совмещать в одной комнате.

Образцы

Образцы мокроты с положительным мазком используются для следующих тестов: GenoType® MTBDRplus, (V1)/ (V2), GenoType® MTBDRsl, GenoType® Mycobacterium CM/AS, GenoType® MTBC.

GenoType® MTBDRplus (V2) – Идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к рифампицину и/или изониазиду в мокроте с положительным и отрицательным мазком.

Прямой материал: мокрота, бронхоальвеолярный смыв, плевральная и спинномозговая жидкость от больных легочным и внелегочным формами туберкулеза. Материал должен быть обработан NaOH-NALC.

Культуральные изоляты пригодны всех видов тестов.

Оборудование и материалы

Комната для приготовления образцов	
1	Латексные перчатки без пудры
2	Хирургический (одноразовый) халат
3	маски N95
4	Шапочка

5	Водяная баня (или heating блок)
6	Микроцентрифуги (1,5 мл пробирки)
7	Пробирки с винтовыми крышками, 1,5 мл (для выделения ДНК)
8	Штативы для 1,5 мл пробирок
9	Регулируемые пипетки 500 мкл
10	Регулируемые пипетки, 1000 мкл
11	Регулируемые пипетки 100 мкл
12	Штативы для пипеток
13	Наконечники с фильтром для вышеуказанных пипеток
14	контейнер для мусора с полиэтиленовым пакетом и свежеприготовленным 1% раствором хлора
15	Бумажные полотенца и их блок/дозатор
16	одноразовые коробки для отходов «Biohazard»
17	Распылитель с 1% раствором хлора (свежеприготовленный раствор отбеливателя из магазина)
18	Распылитель для 70% спирта
19	Термометр
20	Таймер
21	Маркер
22	Вортекс
23	ПЦР Hood – настольный ламинарный минибокс, для добавления ДНК
24	Положительный контроль
25	Образцы
26	GenoLyse реагенты

Комната для приготовления реагентов «Master Mix»

1	Лабораторный халат + крючки для одежды
2	Одноразовые перчатки из латекса без пудры
3	ПЦР Hood-("шапка")–настольный ламинарный минибокс для приготовления мастер микс.
4	Регулируемые пипетки 10 мкл
5	Регулируемые пипетки 20 мкл
6	Регулируемые пипетки 200 мкл
7	Регулируемые пипетки, 1000 мкл
8	Штативы для пипеток

9	Наконечники с фильтром для вышеуказанных пипеток
10	ПЦР пробирки (200 мкл) с крышками
11	Пробирки с винтовыми крышками, 1,5 мл
12	Штативы для 1,5 мл пробирок
13	Бумажные полотенца и их блок/ дозатор
14	Вортекс
15	Маркер
16	Контейнер для мусора с полиэтиленовым пакетом и свежеприготовленный 1% раствор хлора
17	Biohazard – одноразовые коробки отходов
18	Распылитель для 1% раствора хлора (свежеприготовленный)
19	Распылитель для 70% спирта
20	Таймер
21	Стеклянный стакан
22	Алюминиевая фольга
23	Мини-спин центрифуга (Mini spin)
24	Реагенты для «мастер микс»

Комната для амплификации и гибридизации	
1	Лабораторный халат + крючки для одежды
2	Одноразовые перчатки из латекса без пудры
3	Twincubator – термошейкер для гибридизации
4	Термоциклер с подогреваемой крышкой
5	Регулируемые пипетки 200 мкл
6	Регулируемые пипетки 1000 мл
7	Штатив для пипеток
8	Наконечники с фильтром для вышеуказанных пипеток
9	Пластиковые пастеровские пипетки, 1 мл нестерильные
10	Контейнер для мусора с полиэтиленовым пакетом и свежеприготовленным 1% раствором хлора
11	специальные коробки для отходов «Biohazard»
12	Распылитель с 1% свежеприготовленным раствором хлора в специальных бутылках по 250, 500 мл.
13	Распылитель с 70% спиртом в специальных бутылках по 250, 500 мл.
14	Бумажные салфетки и их блок/дозатор

15	Маркер
16	Пинцет / щипцы (чистые)
17	Фильтровальная бумага
18	Клейкая лента
19	Ножницы
20	Стерильная дистиллированная вода
21	Алюминиевая фольга
22	Таймер
23	Пластиковый поддон для отбросов от гибридизации (можно однократно использовать коробки от наконечников), 1% раствор хлорсодержащего отбеливателя (приобретается в магазине и разводится до нужной концентрации)
24	Стерильные 15 мл пробирки, а также штативы для них
25	Чистый лоток для стрипов
26	Водяная баня
27	Реагенты для MTBDRplus

Требования к подготовке комнат при проведении «Хайн теста», ПЦР

Комната для экстракции ДНК

Еженедельная уборка комнат:

- В начале каждой недели, комната для выделения ДНК должна быть тщательно очищена;
- Очистка должна быть сверху-вниз, начиная с полок и заканчивая полом;
- Как только верхняя поверхность будет очищена, пол должен быть также тщательно обработан;
- Пол очищается свежеприготовленным 1% раствором гипохлорита натрия, при необходимости (контаминация) готовят более концентрированный раствор;
- Далее пол обрабатывается чистой ветошью, смоченной 70% спиртом, ветошь перед этим должна быть промыта в проточной воде.

Бокс биологической безопасности (БШБ):

Ежедневно:

- Надеть защитный халат, маску и перчатки.
- Очистить БШБ тщательно перед и после каждой партии образцов.
- 1% раствор гипохлорита натрия следует использовать первым, а затем 70% этанол с интервалом в 30 секунд. Если обработка проводится в конце работы, то экспозиция 1% раствора гипохлорита натрия должна быть не менее 20 минут.
- Также очистить стекла; включить свет от вытяжки после очистки.

Еженедельно:

- Надеть защитную одежду, маску и перчатки;
- Подготовить достаточное количество салфеток или миниполотенец, смоченных в свежеприготовленном растворе 1% гипохлорита натрия и 70% этанола, помещенных в закрытый сосуд (например в химический стакан, накрытый чашкой Петри);
- Снимите внутреннюю рабочую поверхность БШБ и очистите его и весь его интерьер полностью свежеприготовленным 1% гипохлоритом натрия и 70% этанолом, как описано выше;
- Стеклоянная поверхность БШБ должны быть также очищена с обеих сторон;
- После очистки, выполните тест «дыма», чтобы убедиться, что БШБ функционирует должным образом, то есть вентиляционные отверстия «засасывают» воздух.

Центрифуги и нагревательный блок:

Ежедневно:

- После очистки БШБ, очистить центрифугу и нагревательный блок точно так же, как шкаф;

- Используйте свежеприготовленный 1% раствор гипохлорита натрия затем 70% этанол, как на внутренних, так и наружных поверхностях этого оборудования;
- Нагревательный блок должен быть комнатной температуры перед началом чистки.

Ультразвуковая баня:

Ежедневно:

- После очистки БШБ и центрифуги, очистить только поверхность ультразвуковой бани, как описано выше;

Еженедельно:

- Вылить старую воду;
- Тщательно очистить внутреннюю поверхность 1% раствором гипохлорита натрия, затем 70% этанолом.

Комната для приготовления реагентов – «мастер микс», пре-амплификация

Меры предосторожности:

- Все процедуры «мастер-микс» необходимо проводить рано утром, первыми. Не следует заниматься этой работой после 10 часов утра во избежание контаминации.
- Абсолютно никакие образцы или ампликоны не должны попасть в эту комнату.
- Реагенты, которые были удалены из этой комнаты не должны быть возвращены в нее вновь, обратно.
- Нельзя вносить и использовать сотовые телефоны в этой комнате.
- Пипетки и другие необходимые инструменты для приготовления ПЦР реагентов должны храниться и всегда должны использоваться исключительно в этой зоне.
- Каждый реагент следует отложить в сторону прежде, чем работать со следующим реагентом, чтобы избежать загрязнения предыдущего реагента, либо последующего раствора.

- Все моющие средства, ветошь, швабры для этой комнаты должны храниться только в этой комнате.
- Обычный лабораторный персонал, который делает уборку вообще в лаборатории, не должен иметь доступ к этой комнате, так как загрязняющие вещества из других комнат могут попасть в эту зону.
- Лучше, если уборку этой площади будет проводить работающий в этой комнате лаборант.
- Если несколько раундов ПЦР проводятся в один и тот же день, то все смеси «мастера-микса» должны приготавливаться в одно и то же время, а именно рано утром, во избежание контаминации; потом можно перейти в другую часть ПЦР лаборатории для последующего добавления ДНК.

Еженедельная уборка:

- В начале каждой недели комната для «мастер-микс»-преамплификации должна быть тщательно очищена.
- Очистка должна быть сверху-вниз, начиная с полок и заканчивая полом.
- Как только верхняя поверхность будет очищена, пол должен быть также тщательно обработан
- Пол очищается 1% раствором гипохлорита натрия, при необходимости (контаминация) готовят более концентрированный 5-10% раствор гипохлорита
- далее пол обрабатывается чистой ветошью, смоченной 70% спиртом, ветошь перед этим должна быть промыта в проточной воде.

Полки, в том числе пипетки и ПЦР-оборудование:

Ежедневно:

- Наденьте защитную одежду, маску и перчатки.
- Очистите полки и ПЦР оборудование тщательно, прежде чем начинать работу.

- Используйте свежеприготовленный 1% раствор гипохлорита натрия первым, а затем с интервалом в 30 секунд 70% этанол;
- После очистки, приготовьте смесь «мастер-микса»;
- Когда реагенты будут подготовлены, поверхности и ПЦР-оборудование должны быть очищены снова, как указано выше.

Комната для амплификации и гибридизации

Еженедельная уборка:

- В начале каждой недели, комната для амплификации должна быть тщательно очищена.
- Очистка должна быть сверху-вниз, начиная с полок и заканчивая полом.
- Как только верхняя поверхность будет очищена, пол должен быть также тщательно вычищен.
- Пол должен быть вытерт свежеприготовленным 1% раствором гипохлорита натрия, сначала с помощью слабого раствора хлорки и затем готовят более концентрированный 5-10% раствор гипохлорита натрия (при опасности контаминации)
- Далее пол обрабатывается чистой ветошью, смоченной 70% спиртом, ветошь перед этим должна быть промыта в проточной воде.

Полки, в том числе термоциклер, пипетки и ПЦР-оборудование:

Ежедневно:

- Надеть защитную одежду, маску и перчатки.
- Очистить полки и ПЦР оборудование тщательно, прежде чем начинать работу.
- Использовать свежеприготовленный 1% раствор гипохлорита натрия первым (в конце работы экспозиция 20 минут), а затем с интервалом в 30 секунд 70% этанол.
- Осторожно добавить шаблон ДНК в каждую реакционную пробирку и поместить пробирки в амплификатор.

- После запуска термоциклера, очистить полки и ПЦР-оборудование, как указано выше.
- После гибридизации очистить полки снова.
- Использованные наконечники и ПЦР пробирки должны быть помещены в соответствующие ведра отходов и автоклавированы, чтобы уничтожить любые загрязнения ампликонами.
- Если ПЦР пробирки сохраняются после завершённого теста (для возможной повторной гибридизации), они должны храниться в холодильнике или морозильной камере отдельно от других реагентов или набора компонентов.

Термоциклер (ПЦР машина):

Еженедельно:

- Надеть защитную одежду, маску и перчатки.
- Очистить внешнюю поверхность термоциклера тщательно.
- Использовать свежеприготовленный 1% раствор гипохлорита натрия первым (в конце работы экспозиция 20 минут), а затем с интервалом в 30 секунд на 70% раствор этанола.

Термоциклер ®:

Ежедневно:

- Надеть защитную одежду и перчатки.
- Очистить внешнюю поверхность термошейкера (TwinCubator®) для гибридизации, а затем и все внутри, включая стеклянную крышку свежеприготовленным 1% раствором гипохлорита натрия (в конце работы экспозиция 20 минут), а затем 70% раствором этанола.

Литература

1. Global Tuberculosis report, WHO 2012. Source: Global tuberculosis database, WHO, 2011.
2. WHO Global tuberculosis report 2012. WHO document WHO/HTM/TB/2012.6.Geneva, 2012.
3. Guidelines for Programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis. WHO Geneva 2011.
4. Laboratory biosafety manual. 3rd edition. WHO/CDC/CRS/LYO/2004.11, Geneva. 2004.
5. Biosafety in microbiological biomedical laboratories, 5th edition. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, 2009
6. Tuberculosis laboratory biosafety manual. WHO/HTM/TB/2012.11.Geneva. 2012.
7. WWW.hain-lifescience.com/products/msdcs.html
8. WWW.hain-lifescience.de
9. Doris Hillemann, Michael Weizeneegger, Tanja Kubica et.al. Use of Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampicin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Complex Isolates//J.Clin.Microbiology.-2005.-Vol.43, №8 - P.3699-3703
10. Абилдаев Т.Ш., Аленова А.Х, Бисмилда В.Л. и др. Опыт применения MTBDR plus в экспресс диагностике мультирезистентного туберкулеза. //Здоровье и болезнь.- 2012.- №6. (108).- С.57-63
11. Аленова А.Х, Бисмилда В.Л., Ибраева А.Р. и др. Результаты применения MTBDR plus и генотипирования ДНК M. Tuberculosis в различных регионах Казахстана. //Материалы I конгресса Национальной ассоциации фтизиатров Российской Федерации – СПб., 2012г.- С.-36-37.
12. Alenova A.Kh. , Bismilda V.L. , Ibrayeva A.R. , Abildayev T.Sh. , Iglukova Sh.K., Chinguisova L.T., Momynaliev K.T. Molecular genetic identification of multidrug resistant strains of M. tuberculosis of different regions of Kazakhstan.// VI International Congress of pulmonologist of Central Asia, May 16-18,2013, Osh, Kyrgyzstan, P. 21.

13. Аленова А.Х., Бисмилда В.Л., Игликова Ш.К. и др. Особенности мутаций и семейства клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Казахстане.// Фтизиопульмонология-2013. №1(2013). -С. 47-50.
14. Marinus Barnard, Linda Parsons, Paolo Miotto, Daniella Cirillo, Knut Feldman, Cristina Guteierrez, Akos Somoskovi Find, Avenue de Bude 16, 1202 Geneva. 2013. Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis by Line Probe Assay. Laboratory Manual for Resource –Limited Setting.
15. Florence Brossier, Nicolas Veziris, Alexandra Aubry et.al Detection by genotype MTBDRsl Test of Complex Mechanism of Resistance to second – Line Drugs and Ethambutol in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates //J.Clin.Microbiology.- 2010-Vol.48, №5- P.1683-1889.
16. S.Naidoo (Lancet Laboratories South Africa) Evaluation of GeneXpert MTB/RIF assay on pulmonary and extrapulmonary samples in high throughput routine laboratory. ECCMID, Vienna, April, 2010.
17. Cepheid GeneXpert Dx System. Operator Manual. Software version 4.0. 300–7607, Rev. C.1 Вкладыш к упаковке Cepheid GeneXpert GXMTB/RIF-10 300-6252 Rev. D, September 2010.
18. Руководство пользователя Cepheid GeneXpert Dx System Software version 4.0. 300–7607, Rev. C.17.
19. Alenova A., Abildaev T., Adenov M., Bismilda V., Koptleuova A. The comparison of Xpert MTB/RIF with BACTEC MGIT 960 for rapid detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* in Kazakhstan. «44 World Conference on TB & Lung diseases». Paris. – 2013, PC -1009-03.