

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор центра постгеномных технологий
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Центр стратегического плани-
рования и управления медико-биологиче-
скими рисками здоровью» Федерального ме-
дико-биологического агентства Российской
Федерации (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

Г.А. Шипулин

2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
набора реагентов для выявления генов бета-лактамаз
расширенного спектра группы СТХ-М
методом изотермической амплификации
«АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP»



ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, улица Погодинская,
д. 10, стр. 1

IVD

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
СВЕДЕНИЯ ОБ АНАЛИТАХ	5
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	7
СОСТАВ	9
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	12
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	16
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	19
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	22
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	23
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	25
ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	31
А. Подготовка проб для амплификации.....	31
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	32
В. Анализ и интерпретация результатов	33
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	38
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	40

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БЛРС	- бета-лактамазы расширенного спектра
ВКО	- внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	- нуклеиновые кислоты
ПКО	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контроль LAMP
LAMP	- изотермическая петлевая амплификация (loop-mediated amplification)
OK	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
СОП № 23 ПКО ДНК СТХ-М-1/2/9	- стандартный образец предприятия № 23 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагмент гена бета-лактамазы группы СТХ-М-1, фрагмент гена бета-лактамазы группы СТХ-М-2 и фрагмент гена бета-лактамазы группы СТХ-М-9»
РУ	- регистрационное удостоверение
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления генов бета-лактамаз расширенного спектра группы СТХ-М методом изотермической амплификации «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP», далее – набор реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP», предназначен для выявления (качественного определения) генов бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) основной группы СТХ-М (включая подгруппы СТХ-М-1-подобных, СТХ-М-2-подобных и СТХ-М-9-подобных) у энтеробактерий в биологическом материале человека методом изотермической петлевой амплификации (LAMP) с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Биологическим материалом для проведения анализа являются клинические образцы (моча) и бактериальные культуры (положительные гемокультуры, чистые бактериальные культуры или смеси бактериальных культур).

Функциональное назначение – вспомогательное средство для диагностики *in vitro*.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Выявление фрагментов ДНК генов БЛРС группы СТХ-М методом LAMP проводится пациентам с клинической симптоматикой инфекций различной локализации (инфекции мочевых путей, интраабдоминальные инфекции и другие), вне зависимости от их половой и возрастной категории, расовой принадлежности.

Область применения

Клиническая лабораторная диагностика инфекций различной локализации (преимущественно инфекций мочевых путей и интраабдоминальных инфекций).

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с клиническими и/или лабораторными признаками инфекций различной локализации, в первую очередь, инфекций мочевыводящих путей или интраабдоминальных инфекций.

Противопоказания к применению отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

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

Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

Сведения об анализе

Набор реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP» предназначен для выявления у энтеробактерий генов бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) основной распространенной в настоящее время группы СТХ-М (включая подгруппы СТХ-М-1-, СТХ-М-2- и СТХ-М-9-подобных) – генетических детерминант резистентности бактерий к бета-лактамным антибиотикам, включая цефалоспорины 1-4 поколений (за исключением карбапенемов и цефамицинов). Данный набор реагентов может использоваться при проведении лабораторной диагностики инфекций различной локализации, вызываемых энтеробактериями, в первую очередь, инфекций почек и мочевыводящих путей, интраабдоминальных инфекций.

Бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС, соответствующая англоязычная аббревиатура – ESBL) – ферменты, гидролизующие большинство пенициллинов и цефалоспоринов, включая цефалоспорины 3-4 поколений, а также монобактамы (азтреонам), но не гидролизующие карбапенемы и цефамицины (цефокситин). Большинство из них относятся к бета-лактамазам класса А и подавляются ингибиторами бета-лактамаз – клавулановой кислотой, сульбактамом, авибактамом. Продукция БЛРС встречается у различных клинически значимых видов энтеробактерий, но наиболее часто продуцентами БЛРС являются *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Подавляющее большинство БЛРС является приобретенными ферментами, кодирующие их гены располагаются на трансмиссивных плазмидах, что обуславливает возможность их передачи между различными изолятами и изолятами разных видов.

В сформированном Всемирной организацией здравоохранения перечне приоритетных антибиотикорезистентных

бактерий в группу максимального приоритета включены наряду с энтеробактериями резистентными к карбапенемам и энтеробактерии резистентные к цефалоспорином 3-го поколения.

Наиболее распространенной группой БЛРС во всем мире является группа СТХ-М. По данным многоцентрового исследования, проведенного в стационарах в различных регионах РФ ферменты группы СТХ-М выявлялись у 92,5% БЛРС-продуцирующих энтеробактерий, тогда как ферменты группы SHV выявлялись у 20,4% изолятов, но в более чем половине случаев в сочетании с ферментами группы СТХ-М. Группа СТХ-М – обширная группа бета-лактамаз класса А, включающая подгруппы СТХ-М-1-, СТХ-М-2- и СТХ-М-8/25- и СТХ-М-9-подобных БЛРС. Наиболее распространенной у клинических изолятов энтеробактерий является подгруппа СТХ-М-1-подобных, и среди них доминирует тип СТХ-М-15. С меньшей частотой в странах Европы встречаются изоляты, продуцирующие ферменты подгруппы СТХ-М-9-подобных и сравнительно редко встречаются продуценты БЛРС подгруппы СТХ-М-2-подобных.

Учитывая высокую частоту выявляемости БЛРС у возбудителей нозокомиальных инфекций (>70 %) и растущую распространенность ферментов этой группы у возбудителей внебольничных инфекций в РФ (8-33 %), выявление продуцентов БЛРС рекомендуется проводить одновременно с определением чувствительности к антибиотикам. Наиболее актуальным в настоящее время является выявление продуцентов БЛРС при внебольничных инфекциях и ранних нозокомиальных инфекциях, вызываемых энтеробактериями.

Список литературы:

1. «Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов». Методические рекомендации Российской некоммерческой общественной организации «Ассоциация анестезиологов-реаниматологов», Межрегиональной общественной организации «Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов», Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), общественной организации «Российский Сепсис Форум» // Вестник анестезиологии и реаниматологии – 2020 – Т. 17, N 1. – С. 52-83
2. «Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов» Методические рекомендации (обновление 2022 г.). // «Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов»: официальный сайт. URL: <https://antimicrob.net/1231241-2/> (дата обращения: 21.04.2023). – Текст : электронный.

3. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015-2016»// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия – 2019 – Т. 21, N 2. – С. 147-159.
4. Яковлев С. В., Суворова М.П., Быков А. О. Инфекции, вызванные карбапенеморезистентными энтеробактериями: эпидемиология, клиническое значение и возможности оптимизации антибактериальной терапии// Антибиотики и Химиотерапия – 2020 – Т. 65, N 5-6
5. Rafael Cantón, José María González-Alba, and Juan Carlos Galán. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion // Front Microbiol. – 2012 – v.3: - p110.
6. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В. и др. Антибиотикорезистентность внебольничных возбудителей инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия – 2019 – Т. 29, N 2 – С. 134-146

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на определении фрагментов ДНК генов БЛРС основной группы СТХ-М методом изотермической петлевой амплификации (LAMP) с флуоресцентной детекцией. Процедура исследования включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала и изотермическую амплификацию фрагментов выявляемых генов-мишеней с флуоресцентной детекцией с помощью мишень-специфичного флуоресцентно-меченого праймера (для каждой мишени).

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала производится в соответствии с Инструкцией по применению в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-L AMR). ВКО-L AMR позволяет контролировать все этапы исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится изотермическая петлевая амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам наборов праймеров и фермента *Bst* полимеразы AMR. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые праймеры, связанные с олигонуклеотидом с гасителем, которые связываются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, встраиваются в один из продуктов реакции, после чего при дальнейшей амплификации происходит вытеснение олигонуклеотида с гасителем и нарастание интенсивности флуоресценции от прикрепленного к праймеру флуорофора.

Это позволяет регистрировать накопление продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе реакции LAMP с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

LAMP-тестирование проводится в 2 пробирках. В пробирке № 1 одновременно проводятся 2 реакции LAMP – амплификация фрагментов генов БЛРС группы *blaCTX-M-1*-подобных, а также последовательности ДНК ВКО-L AMR (внутреннего контрольного образца), в пробирке № 2 также одновременно проводятся 2 реакции LAMP – амплификация фрагментов генов БЛРС группы *blaCTX-M-2*-подобных и группы *blaCTX-M-9*-подобных. Результаты амплификации фрагментов ДНК генов БЛРС различных подгрупп СТХ-М и ДНК ВКО-L AMR регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Наименование LAMP-смеси-FL	Канал для флуорофора	FAM	JOE
СТХ-М-1	ДНК-мишень - группа генов БЛРС	<i>blaCTX-M-1</i> -подобные	ДНК ВКО
	Область амплификации	фрагмент гена группы <i>blaCTX-M-1</i> -подобных	искусственная синтезированная последовательность
СТХ-М-2/9	ДНК-мишень - группа генов БЛРС	<i>blaCTX-M-2</i> -подобные	<i>blaCTX-M-9</i> -подобные
	Область амплификации	фрагмент гена группы <i>blaCTX-M-2</i> -подобных	фрагмент гена группы <i>blaCTX-M-9</i> -подобных

СОСТАВ И КОМПЛЕКТНОСТЬ

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК Аллегро» вариант 100 и «LAMP-комплект» вариант FRT-96 F;

Форма 2 включает комплекты реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100, «БК-3-step» вариант 100 и «LAMP-комплект» вариант FRT-96 F.

Комплект реагентов «ДНК Аллегро» вариант 100 предназначен для проведения предварительной обработки и экстракции тотальной ДНК из биологического материала экспресс-методом в целях исследования полученных образцов методом амплификации нуклеиновых кислот.

Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100 предназначен для проведения предварительной обработки и экстракции (выделения) тотальной РНК/ДНК из биологического материала в целях исследования полученных образцов методом амплификации нуклеиновых кислот.

Комплект реагентов «БК-3-step» вариант 100 предназначен для проведения предварительной обработки и экстракции тотальной ДНК из образцов бактериальных культур экспресс-методом в целях исследования полученных образцов методом амплификации нуклеиновых кислот.

Комплект реагентов «LAMP-комплект» вариант FRT-96 F предназначен для проведения изотермической амплификации фрагментов генов БЛРС группы СТХ-М с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений.

СОСТАВ

«ДНК Аллегро» вариант 100 – комплект реагентов для проведения предварительной обработки и экстракции ДНК из биологического материала, включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ТС-Аллегро	Прозрачная бесцветная жидкость	27	1 флакон

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ЛР-Аллегро	Прозрачная бесцветная жидкость с белым осадком	0,3	100 пробирок в групповой упаковке

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли.

«Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100 – комплект реагентов для проведения предварительной обработки и экстракции (выделения) тотальной РНК/ДНК из биологического материала, включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий буфер Комбо	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ¹	50	1 флакон
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	1	2 пробирки
Раствор для отмывки Комбо-1	Прозрачная бесцветная жидкость	70	1 флакон
Раствор для отмывки Комбо-2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок
ТС-Аллегро	Прозрачная бесцветная жидкость	12	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли.

«БК-3-step» вариант 100 – комплект реагентов для проведения предварительной обработки и экстракции тотальной ДНК из образцов бактериальных культур экспресс-методом, включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ЛР-3-step	Прозрачная бесцветная жидкость	28	2 флакона

¹ При хранении при температуре от 2 до 8°C возможно образование осадка в виде кристаллов.

«LAMP-комплект» вариант FRT-96 F – комплект реагентов для изотермической амплификации фрагментов генов БЛРС группы СТХ-М с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Часть 1			
LAMP-смесь-FL СТХ-М-1	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	0,3	2 пробирки
LAMP-смесь-FL СТХ-М-2/9	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	0,3	2 пробирки
LAMP-буфер-AMR	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
<i>Bst</i> полимеразы AMR	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Часть 2			
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО-L AMR	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО СТХ-М	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации (всего 96 тестов), включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей:

Часть 1 – температура хранения от минус 24 до минус 16 °С;

Часть 2 – температура хранения от 2 до 8 °С.

Комплектность:

- Набор реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP»

Вид исследуемого материала	Комплект реагентов для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Моча	«Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100	«LAMP-комплект» вариант FRT-96 F	2×10^3
	«ДНК Аллегро» вариант 100		5×10^3
Бактериальная культура	«ДНК Аллегро» вариант 100 «БК-3-step» вариант 100		1×10^5

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных генов БЛРС группы СТХ-М.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК штаммов следующих микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл:

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (не обладающих генами БЛРС группы СТХ-М), *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, а также геномной ДНК человека.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов LAMP.

Непригодными для исследования являются образцы, объем, условия/срок хранения и транспортировки которых не соответствуют требованиям, указанным в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Для оценки потенциальной интерференции выбрали эндогенные (гемоглобин, креатинин, мочевина, альбумин) и экзогенные (тобрамицин, гепарин, триптиказо-соевый бульон) вещества, которые могут присутствовать в клинических образцах человека (моче) и бактериальных культурах (положительных гемокультурах, чистых бактериальных культурах или смеси бактериальных культур).

Таблица 3 – Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ)

Биоматериал	Вид ПИВ	Потенциально интерферирующие вещества с концентрацией	Концентрация ПИВ	Наличие интерферирующего эффекта
Моча	Эндогенные вещества	Креатинин	5 мг/дл	Не обнаружено
		Мочевина	90 мг/дл	Не обнаружено
		Альбумин	5 мг/дл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Тобрамицин	51,4 ммоль/л	Не обнаружено
Бактериальные культуры	Эндогенные вещества	Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
		Альбумин	50 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Гепарин	3000 Ед/л	Не обнаружено
		Триптиказо-соевый бульон	1 % v/v	Не обнаружено

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования была определена для набора реагентов в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения СОП № 23 ПКО ДНК СТХ-М-1/ 2/ 9 с концентрациями 5×10^3 копий/мл и 1×10^5 копий/мл при экстракции ДНК комплектом реагентов «ДНК Аллегро» (форма 1), 2×10^3 копий/мл при экстракции ДНК комплектом реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» (форма 2), и с концентрацией 1×10^5 копий/мл при экстракции ДНК комплектом реагентов «БК-3-step» (форма 2). В качестве отрицательных образцов были использованы образцы биоматериала, не содержащие генов БЛРС группы СТХ-М.

Таблица 4 — Воспроизводимость исследования для набора реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP»

Тип образцов	Внутри постановки (повторяемость)		Между лабораториями		Итого	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Экстракция ДНК комплектом реагентов «ДНК Аллегро» – форма 1						
СОП ПКО 5×10^3 копий/мл	6	100	12	100	18	100
СОП ПКО 1×10^5 копий/мл	6	100	12	100	18	100
Отрицательные	6	100	12	100	18	100
Экстракция ДНК комплектом реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» – форма 2						
СОП ПКО 2×10^3 копий/мл	6	100	12	100	18	100
Отрицательные	6	100	12	100	18	100
Экстракция ДНК комплектом реагентов «БК-3-step» – форма 2						
СОП ПКО 1×10^5 копий/мл	6	100	12	100	18	100
Отрицательные	6	100	12	100	18	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические показатели набора реагентов определены по результатам клинических испытаний и рассчитаны на основании сопоставления результатов тестирования одних и тех же образцов мочи и бактериальных культур (положительных гемокультур, чистых бактериальных культур и смеси бактериальных культур) набором реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP» и системой сравнения: набором реагентов «Ба-кРезиста GLA» (производства «ДНК-технология», РФ, РУ № РЗН 2020/11171) для определения генов БЛРС группы СТХ-М-1 и исследования методом секвенирования по Сэнгеру или методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) участков соответствующих генов БЛРС группы СТХ-М для выявления генов БЛРС групп СТХ-М-2 и СТХ-М-9.

Результаты применения набора реагентов представлены в таблице 5.

Диагностические характеристики набора реагентов представлены в таблице 6.

Таблица 5 – Результаты тестирования набора реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP» и системой сравнения

Вид исследуемого материала (общее количество образцов)	Результаты применения набора реагентов	Результаты применения системы сравнения	
		Обнаружены гены БЛРС группы СТХ-М (положительные)	Не обнаружены гены БЛРС группы СТХ-М (отрицательные)
Моча	Обнаружены гены БЛРС группы СТХ-М (положительные)	82	0
	Не обнаружены гены БЛРС группы СТХ-М (отрицательные)	0	86
Бактериальные культуры	Обнаружены гены БЛРС группы СТХ-М (положительные)	63	0
	Не обнаружены гены БЛРС группы СТХ-М (отрицательные)	0	66

Таблица 6 – Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® БЛРС СТХ-М LAMP»

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Моча	100 % (96,41-100 %)	100 % (96,58-100 %)
Бактериальные культуры	100 % (95,36-100 %)	100 % (95,56-100 %)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся к III группе патогенности, должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе необходимо всегда выполнять следующие требования: рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

-Температура в помещениях лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.

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

-Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

-Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

-Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты LAMP) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами LAMP лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

-Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

-Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка LAMP, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

-Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения LAMP-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

-Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

-К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

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

-Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

-Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

-Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

-Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

-При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

2. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).

2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

3. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).

7. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

8. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

11. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).

2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).

3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).

4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).

6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).

7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axugen», США).

8. При использовании комплекта «БК-3-step» - одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся микропробирки или плотно закрывающиеся микропробирки с фиксатором крышки

(«safe lock») объемом 1,5 мл.

9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).

10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Ахуген», США).

11. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).

12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

13. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

14. Емкость с дезинфицирующим раствором.

15. Система для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологического материала Auto-Pure 96 для диагностики *in vitro* (Allsheng, Китай)

Изотермическая амплификация с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмБХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific («Термо Фишер Сайентифик»), США), ДТпрайм («ДНК Технология», Россия).

8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер на 50-60 мл. Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов, чтобы в мочу не попали выделения из них.

Для транспортировки образцы мочи из стерильный флакона или контейнера могут быть перенесены в пробирку-вакутейнер для мочи с консервантом (включающим борную кислоту, формиат натрия, борат натрия) или без консерванта.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб. Нативные и предварительно обработанные образцы мочи:

- при температуре 2–8 °С — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С — длительно.

Не допускается замораживание материала.

Чистая бактериальная культура, гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала на жидкую или плотную питательную среду

Допускается хранение бактериального осадка или суспензии бактериальных клеток до проведения исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Моча

Взболтать флакон с мочой. Перенести 1 мл мочи в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл, используя отдельный наконечник с фильтром для каждого образца. Центрифугировать 10 мин при 10 000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). При наличии большого количества солей после центрифугирования мочи ресуспендировать только верхний слой осадка мочи в объеме 1 мл раствора 0,9 % натрия хлорида и затем снова центрифугировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, удалить надосадочную жидкость полностью или оставляя не более 50 мкл жидкости, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

Полученные после предварительной обработки осадки мочи ресуспендировать в 0,1 мл ТС-Аллегро и с полученными образцами провести процедуру экстракции ДНК в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Полученные после предварительной обработки образцы (суспензии осадков мочи) можно хранить:

- при температуре не выше минус 16 °С – в течение недели,
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Чистая бактериальная культура, гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала на жидкую питательную среду

Перенести от 0,1 до 0,25 мл гемокультуры или посева на жидкую среду обогащения в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл (с помощью одноразового шприца).

Центрифугировать 10 мин при 10 000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра. Ресуспендировать полученный осадок в **0,25 мл ТС-Аллегро** (форма 1) или **0,25 мл ЛР-3-step** (форма 2). Полученную суспензию использовать для проведения экстракции ДНК.

Для образцов бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на плотную питательную среду, приготовить суспензию бактериальных клеток. Приготовление суспензии бактериальных клеток проводится в реагенте **ТС-Аллегро** (форма 1) или в реагенте **ЛР-3-step** (форма 2). Для этого внести около 10^7 - 10^9 бактериальных клеток, взятых петлей или стерильным наконечником, в подготовленную пробирку с 0,25 мл реагента ТС-Аллегро или реагента ЛР-3-step. Полученную суспензию использовать для проведения экстракции ДНК. При использовании для экстракции ДНК комплекта «ДНК Аллегро» (форма 1) допускается приготовление суспензии бактериальных клеток в PBS-буфере или в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 0,25 мл.

Полученные после предварительной обработки образцы (суспензии бактериальных культур) можно хранить:

- при температуре не выше минус 16 °С – в течение недели,
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- изотермическая амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Экстракцию ДНК из предварительно обработанных образцов мочи проводят комплектами реагентов «ДНК Аллегро» (форма 1) или «Магно-Сорб-Комбо ТС» (форма 2) в соответствии с Инструкцией по применению.

Экстракцию ДНК из образцов бактериальной культуры проводят с использованием комплекта реагентов «ДНК Аллегро», входящего в состав формы 1, или «БК-3-step», входящего в состав формы 2 набора реагентов.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО- L AMR). В качестве пробы В- используется реактив ОКО.

Полученная в результате экстракции ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°С – 1 год и более. При экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» полученная ДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 5 суток. При экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «ДНК Аллегро» или «БК-3-step» не рекомендуется хранить полученную ДНК при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С более 8 часов.

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «ДНК-Аллегро»

1. Подготовить необходимое количество полипропиленовых пробирок, содержащих Реагент ДНК-Аллегро (пробирки объемом 1,5 мл с фиксатором крышки типа «Safe Lock»).

2. Осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.

3. Внести в пробирки с подготовленным Реагентом Аллегро по **20 мкл ВКО-L AMR**.

4. Используя отдельные наконечники с фильтром внести по **30 мкл** подготовленной бактериальной суспензии или суспензии обработанного осадка мочи в пробирки с реагентом ДНК-Аллегро.

5. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **30 мкл** ОКО.

6. Плотнo закрыть крышки пробирок на 1,5 мл и перемешать содержимое на вортeксе, а затем осадить капли с крышек капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.

7. Перенести пробирки на 1,5 мл в предварительно разогретый до температуры **95 °С** термостат и инкубировать в течение **5 минут**.

8. Перенести в штатив прогретые пробирки, а затем тщательно перемешать содержимое пробирок на вортeксе.

9. Центрифугировать пробирки в течение 2 минут при 10 000 г (13 тыс. об/мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf).

10. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

ВНИМАНИЕ! Не допускать попадания белого осадка из Реагента ДНК-Аллегро в пробирки с LAMP смесью. Осадок может ингибировать LAMP.

Экстракция ДНК из бактериальных культур с использованием комплекта реагентов «БК-3-step»

1. Подготовить необходимое количество полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с фиксатором крышки типа «Safe Lock» для экстракции ДНК из исследуемых проб и отрицательного контроля.

2. Внести в пробирки по 0,25 мл реагента **ЛР-3-step**.

3. Внести в пробирки с реагентом ЛР-3-step по **20 мкл ВКО-L AMR**, закрыть крышки, промаркировать пробирки.

4. Используя отдельные наконечники с фильтром внести по **20 мкл** подготовленной бактериальной суспензии в пробирки с реагентом ЛР-3-step.

5. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести 20 мкл ОКО.

6. Плотнo закрыть крышки пробирок на 1,5 мл и перемешать содержимое на вортeксе, а затем осадить капли с крышек капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.

7. Перенести пробирки на 1,5 мл в предварительно разогретый до температуры **90 °C** термостат и инкубировать в течение **5 минут**.

8. Центрифугировать пробирки в течение **2 минут** при **10 000 g** (**13 тыс. об/мин** на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf).

9. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК и РНК.

ВНИМАНИЕ! Не допускать попадания осадка в пробирки с LAMP смесью. Осадок может ингибировать LAMP.

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» и автоматической станции для экстракции НК

1. Лизирующий буфер Комбо (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре 60 °C до полного растворения кристаллов.

2. Смешать в отдельной пробирке **ВКО-L AMR**, **Буфер GT** и **Магнитный сорбент** из расчета на один образец **20 мкл ВКО**, **10 мкл Буфера GT** и **20 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.

3. Внести в пробирки или лунки глубоколоночного планшета (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов по **50 мкл** подготовленной смеси **ВКО-L AMR**, **буфера GT** и **Магнитного сорбента**.

4. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, Буфера GT и магнитного сорбента **500 мкл Лизирующего буфера Комбо**.

5. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО-L AMR, буфера GT, магнитного сорбента и Лизирующего буфера Комбо по **100 мкл** исследуемых образцов.

6. В пробирку отрицательного контроля (OK) выделения внести **100 мкл ОКО**.

7. Поместить на борт автоматической станции, в зависимости от ее модели, емкости с Раствором для отмывки Комбо-1, Раствором для отмывки Комбо-2 и РНК-буфером, или внести в лунки соответствующих размещаемых на автоматической станции глубоколоночных планшетов по **700 мкл Раствора для отмывки Комбо-1, 500 мкл Раствора для отмывки Комбо-2** и по **100 мкл РНК-буфера**.

8. Установить пробирки или планшет с исследуемыми образцами на борт автоматической станции.

9. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами при температуре **60°C** в течение **5 мин**.

10. Поместить пробирки с исследуемыми образцами в магнитный штатив или опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **1 мин**.

11. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **700 мкл Раствора для отмывки Комбо-1** или перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-1.

12. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.

13. Поместить пробирки с исследуемыми образцами в магнитный штатив или опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **1 мин**.

14. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **500 мкл Раствора для отмывки Комбо-2** или перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-2.

15. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.

16. Поместить пробирки с исследуемыми образцами в магнитный штатив или опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **1 мин**.

17. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе или оставив магнитные стержни с намагниченным сорбентом на открытом воздухе в течение **5 минут**.

18. Добавить в пробирки по **100 мкл РНК-буфера** или поместить магнитные стержни в лунки планшета с РНК-буфером.

19. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами при температуре **60°C** в течение **5 минут**.

20. Перенести раствор в чистые пробирки, не вынимая пробирки с магнитным сорбентом из магнитного штатива, или удалить магнитный сорбент из лунок планшета с помощью магнитных стержней.

21. Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» вручную с использованием магнитного штатива

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль выделения). Промаркировать пробирки.

3. Смешать в отдельной пробирке на 1,5 мл ВКО, Буфер GT и Магнитный сорбент из расчета на один образец **20 мкл ВКО, 10 мкл Буфера GT и 20 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.

4. Внести в пробирки по **50 мкл подготовленной смеси ВКО, буфера GT и магнитного сорбента**.

5. Добавить в пробирки **500 мкл Лизирующего буфера Комбо**.

6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим буфером **100 мкл исследуемого образца** и тщательно перемешать на вортексе.

7. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл фосфатного буфера или стерильного физиологического раствора или **100 мкл ОКО** (если он предусмотрен в комплектации набора для амплификации нуклеиновых кислот). В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **ПКО** (не более **100 мкл**), если он предусмотрен для проведения тестирования в комплектации набора для амплификации нуклеиновых кислот.

8. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе.

9. Прогреть пробирки **5 мин при температуре 60 °С** в термостате.

10. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **1 мин**.

Примечание. Необходимо открыть крышки до постановки в магнитный штатив, если в магнитном штативе их неудобно/невозможно открыть без взмучивания сорбента.

11. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, аккуратно отобрать надосадочную жидкость по внутренней стенке, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки Комбо-1**, закрыть крышки.

Примечание. Необходимо поставить пробирки в обычный штатив, если в магнитном штативе неудобно/невозможно плотно закрыть крышки.

13. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **1 мин**.

14. Открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость как описано выше.

15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки Комбо-2**, перемешать на вортексе, а затем осадить капли кратким центрифугированием.

16. Поместить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость.

17. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **5-10 минут**.

18. Добавить в пробирки по **100 мкл РНК-буфера** и перемешать на вортексе.

19. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С** на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.

20. Кратко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.

21. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

22. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, перенести надосадочную жидкость в новые пробирки.

ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **5 мкл LAMP-смеси-FL (LAMP-смеси-FL СТХ-М-1 или LAMP-смеси-FL СТХ-М-2/СТХ-М-9)**, **10 мкл LAMP-буфера-AMR**, **0,5 мкл *Bst* полимеразы AMR**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте б) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением LAMP-исследования.

2. Разморозить пробирки с указанными **LAMP-смесями-**

FL, LAMP-буфером-AMR. Перемешать содержимое всех реагентов LAMP-комплекта, осадить капли на вортексе. Переворачиванием и аккуратным пипетированием перемешать ***Bst*** полимеразу **AMR**.

В двух отдельных пробирках приготовить 2 реакционные смеси. Смешать необходимое количество: **LAMP-смеси-FL, LAMP-буфера-AMR, *Bst* полимеразы AMR**, перемешать аккуратным пипетированием, осадить капли на вортексе.

3. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для LAMP ДНК исследуемых и контрольных проб.

4. В каждый ряд пробирок внести по одной из двух приготовленных реакционных смесей по **15 мкл** на пробу. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

5. В подготовленные пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

6. Поставить контрольные реакции.

- **положительный контроль LAMP (ПКО)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ПКО СТХ-М**.

- **отрицательный контроль LAMP (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.

- **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести LAMP сразу после соединения реакционных смесей и ДНК-проб и контролей.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции

в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

Таблица 7 – Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного³ и планшетного⁴ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	64	30 сек */ 40 сек **	FAM, JOE ***	50

* для амплификаторов CFX 96 (Bio-Rad) и Rotor-Gene Q (QIAGEN),

** для амплификаторов ДТпрайм (ДНК Технология) и QuantStudio 5 (Thermo Scientific);

для амплификаторов ДТпрайм рекомендуется в конце программы амплификации (после блока циклирования) добавить стадию хранения при температуре 20 °C (для охлаждения блока перед извлечением пробирок).

*** при одновременном проведении амплификации и детекции с использованием других наборов реагентов включается детекция сигнала и по другим используемым для них каналам – для флуорофоров ROX и/или Cy5.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных данных проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения LAMP с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам (см. табл. 1).

³ Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁴ CFX 96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Thermo Scientific), ДТпрайм (ДНК Технология, Россия).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

Принципы интерпретации результатов следующие (см. табл. 8).

Таблица 8 – Принципы интерпретации результатов

Наименование LAMP-смеси-FL	Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора		Результат
	FAM	JOE	
СТХ-М-1	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-1
	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	НЕ обнаружено генов БЛРС группы СТХ-М-1
	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Сомнительный**
СТХ-М-2/9	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-2
	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-9
	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружены гены БЛРС групп СТХ-М-2 и СТХ-М-9
	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружено генов БЛРС групп СТХ-М-2 и СТХ-М-9
	отсутствует значение и получен невалидный результат для реакции с LAMP-смесью-FL СТХ-М-1		Невалидный*
	<u>определено</u> больше граничного	отсутствует	Сомнительный**
	отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	

Наименование LAMP-смеси-FL	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		Результат
	FAM	JOE	
	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> больше граничного	

*В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

В случае получения **сомнительного результата при исследовании образцов биоматериала (мочи) необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

В случае получения **сомнительного результата при исследовании образцов бактериальных культур учитывается отрицательный результат: **НЕ обнаружено генов БЛРС группы СТХ-М-1 или НЕ обнаружено генов БЛРС групп СТХ-М-2 и СТХ-М-9**, соответственно.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Принципы учета общего результата анализа представлены в табл. 9.

Таблица 9 – Общий результат анализа

Результат с LAMP-смесью-FL СТХ-М-1	Результат с LAMP-смесью-FL СТХ-М-2/9	Общий результат анализа
НЕ обнаружено генов БЛРС группы СТХ-М-1	НЕ обнаружено генов БЛРС групп СТХ-М-2 и СТХ-М-9	НЕ обнаружено генов БЛРС группы СТХ-М
Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-1	НЕ обнаружено генов БЛРС групп СТХ-М-2 и СТХ-М-9	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М
Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-1	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-2 <i>или/и</i> Обнаружен ген БЛРС	Обнаружены гены БЛРС группы СТХ-М

Результат с LAMP-смесью-FL СТХ-М-1	Результат с LAMP-смесью-FL СТХ-М-2/9	Общий результат анализа
	группы СТХ-М-9	
НЕ обнаружено генов БЛРС группы СТХ-М-1	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-2 или/и Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-9	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М
Невалидный	Невалидный	Невалидный
Невалидный	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-2 или/и Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М-9	Обнаружен ген БЛРС группы СТХ-М

Результат исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл.10 и вкладывшем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10 — Результаты для контролей различных этапов исследования

Наименование LAMP-смеси-FL	Контроль	Контролируемый этап исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора	
			FAM	JOE
LAMP смесь-FL СТХ-М-1	ПКО	LAMP	<u>определено</u> меньше граничного	не учитывается
	ОК	Экстракция ДНК, LAMP	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
	К-	LAMP	отсутствует	отсутствует
LAMP смесь-FL СТХ-М-2/9	ПКО	LAMP	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
	ОК	Экстракция ДНК, LAMP	отсутствует	отсутствует
	К-	LAMP	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля LAMP (ПКО) значение порогового цикла по каналу для флуорофора FAM для LAMP-смеси-FL СТХ-М-1 или /и по каналу для флуорофора FAM или

/и по каналу для флуорофора JOE для LAMP-смеси-FL СТХ-М-2/9 отсутствует или превышает указанное граничное значение. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов.

2. Для отрицательного контроля LAMP (К-) определено значение порогового цикла (C_t) по одному или нескольким каналам. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе LAMP-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию для всех образцов.

3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM для LAMP-смеси-FL СТХ-М-1 или/ и по каналу для флуорофора FAM или/ и по каналу для флуорофора JOE для LAMP-смеси-FL СТХ-М-2/9. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе LAMP-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (параметрах базовой линии), требуется повторно провести LAMP-исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование.

Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Набор реагентов при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Комплект реагентов «LAMP-комплект» вариант FRT-96 F: Часть 1 в составе реагентов LAMP-смесь-FL CTX-M-1, LAMP смесь-FL CTX-M-2/9, LAMP-буфер-AMR, Bst полимераза AMR, К- хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. LAMP-смесь-FL CTX-M-1 и CTX-M-2/9 хранить в защищенном от света месте.

Часть 2 в составе реагентов ОКО, ВКО-L AMR, ПКО CTX-M хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты не более 3 раз.

Комплекты реагентов «ДНК Аллегро» вариант 100, «Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100, «БК-3-step» вариант 100 хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 119121, г. Москва, ул. Погодинская, дом 10, стр.1, e-mail: promlab@cspfmba.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Руководитель
производственной лаборатории



Ж.Е.Тарасова

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!
Обратитесь к инструкции по применению
Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Беречь от влаги



Знаки опасности