

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора центра постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)



Ж.Е. Тарасова
июль 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления ДНК возбудителей кишечных инфекций *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивных *E.coli*, термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F методом изотермической амплификации

«АмплиТест® ОКИ LAMP»

по ТУ 21.20.23-026-01897400-2023



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАИМЕНОВАНИЕ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	15
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	16
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	16
ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	17
А. Подготовка проб для амплификации	17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	19
В. Анализ и интерпретация результатов	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	24
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	25
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

EIEC	- энтероинвазивные <i>E.coli</i>
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)
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
РУ	- регистрационное удостоверение
ТСID50/мл, ТЦД50/мл	- тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя
КОЕ	- колонеобразующие единицы
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей кишечных инфекций *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивных *E.coli*, термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F методом изотермической амплификации «АмплиТест® ОКИ LAMP» по ТУ 21.20.23-026-01897400-2023 (далее – набор реагентов «АмплиТест® ОКИ LAMP», набор реагентов).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления и дифференциации ДНК возбудителей кишечных инфекций *Shigella* spp. / энтероинвазивных *E.coli*, *Salmonella* spp., термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F в биологическом материале человека (фекалии) методом изотермической петлевой амплификации (LAMP) с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – диагностика острых кишечных инфекций.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Выявление ДНК *Shigella* spp. / энтероинвазивных *E.coli*, *Salmonella* spp., термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F методом LAMP проводится пациентам с клинической симптоматикой кишечной инфекции, подозрительной на инфекцию, вызванную перечисленными патогенами, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам, вне зависимости от их половой и возрастной категории, расовой принадлежности.

Область применения

Клиническая лабораторная диагностика острых кишечных инфекций, эпидемиологический надзор.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике кишечных инфекций для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на кишечную инфекцию, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания. Специфическая патология – заболевания, вызванные *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивными *E.coli*, термофильными *Campylobacter* spp. и аденовирусами группы F.

Материалом для проведения LAMP служат пробы ДНК, выделенные из фекалий с помощью комплектов реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» (РУ № РЗН 2022/19200) или «АмплиТест РИБО-преп» (РУ № РЗН 2020/12985).

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»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-D2), с проведением на следующем этапе исследования реакции изотермической петлевой амплификации (LAMP) участков ДНК выявляемых возбудителей кишечных инфекций и ДНК ВКО IC-D2 с флуоресцентной детекцией с помощью мишень-специфичных флуоресцентно-меченых праймеров для каждой мишени.

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала производится в соответствии с Инструкцией по применению к комплекту реагентов для выделения НК в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО IC-D2). ВКО IC-D2 позволяет контролировать все этапы исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты исследования, служит для исключения ложноотрицательных результатов.

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. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые праймеры, связанные с олигонуклеотидом с гасителем, которые связываются с комплементарным участком амплифицируемых ДНК-мишеней, 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».

Исследование каждого образца проводится в двух пробирках.

При исследовании одновременно в двух пробирках проводятся 2 и 3 реакции LAMP. В пробирке № 1 одновременно проводятся 3 реакции LAMP – амплификация ДНК *Shigella* spp. / *EIEC* (без дифференцировки) и термофильных *Campylobacter* spp., а также последовательности ДНК ВКО IC-D2 (внутреннего контрольного образца), в пробирке № 2 одновременно проводятся 2 реакции LAMP – амплификация ДНК аденовирусов группы F и *Salmonella* spp. Результаты амплификации регистрируются по 3 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора/ LAMP-смесь-FL		FAM	JOE (HEX)	ROX
Shig-Camp	ДНК-мишень	ВКО	<i>Shigella</i> spp., <i>EIEC</i>	термофильные <i>Campylobacter</i> spp.
	Область амплификации	фрагмент генома бактериофага лямбда	ген ipaH	ген CJE0832
Salm-Adeno	ДНК-мишень	-	Аденовирусы группы F	<i>Salmonella</i> spp.
	Область амплификации		ген гексон	ген InvA

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ

Набор реагентов выпускается в одной форме комплектации и содержит комплект реагентов «LAMP-комплект» вариант FRT-50.

Комплект предназначен для проведения реакции амплификации с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» для выявления и дифференциации ДНК *Shigella* spp. / энтероинвазивных *E.coli*, *Salmonella* spp., термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F в качественном формате. Для проведения полного исследования рекомендуется использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» (РУ №

РЗН 2022/19200) (автоматическая экстракция ДНК) или «Ампли-Тест РИБО-преп» (РУ № РЗН 2020/12985) (ручная экстракция ДНК), в соответствии с инструкциями производителя.

Набор реагентов рассчитан на проведение 50 определений.

Комплектность:

Набор реагентов – 1 шт.;

Инструкция по применению – 1 шт.;

Краткое руководство – 1 шт.;

Паспорт качества – 1 шт.;

Вкладыш к набору реагентов – 1 шт.

Состав комплекта «LAMP-комплект» вариант FRT-50:

«LAMP-комплект» вариант FRT-50 – комплект реагентов для изотермической амплификации ДНК *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивных *E.coli*, термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», содержащий в составе:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Часть 1			
LAMP-смесь-FL Shig-Camp	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	0,6	1 пробирка
LAMP-смесь-FL Salm-Adeno	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	0,6	1 пробирка
LAMP-буфер-R2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
<i>Bst</i> полимеразы GTG	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Часть 2			
К+ ОКИ-L	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО IC-D2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
РНК-буфер ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
Элюирующий буфер ²	Прозрачная бесцветная жидкость	10,0	1 флакон

¹ Может применяться для элюции ДНК с помощью комплекта реагентов производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России «АмплиТест РИБО-преп»

² Может применяться для элюции ДНК с помощью комплекта реагентов производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо»

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации (всего 50 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 плюс 2 до плюс 8 °С.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 — Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® ОКИ LAMP»

Вид исследуемого материала	Комплект реагентов для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Фекалии	«АмплиТест РИБО-преп»	5×10 ³
	«АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо»	

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК штаммов следующих микроорганизмов: аденовируса человека 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 21 типа в концентрации не менее 3,0 lg ТЦД 50/мл из коллекции «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»; ДНК штаммов *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* ATCC 29428; *Salmonella infantis* 158/51 (№ 100355), *Salmonella enteritidis* 5765 (№ 100121), *Salmonella typhimurium* 9640 (№ 100002), *Shigella sonnei* «S form» (№ 233169), *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (№ 131116) из рабочей коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, штаммов *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (№ 130249), *Escherichia coli* ATCC 25922 (№ 233169), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 700603 (№ B-7474) в концентрации не менее 1×10⁷ КОЕ/мл из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) ФГБУ

«НЦЭСМП» Минздрава России, а также препарата геномной ДНК человека («Sigma-Aldrich», США) (0,2 мг/мл).

При тестировании вышеперечисленных образцов ложноположительных реакций (результатов) выявлено не было.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Интерферирующие вещества могут находиться в пробе биологического материала или попадать в неё на этапе пробоподготовки. Набор реагентов «АмплиТест® ОКИ LAMP» не используется на первом этапе экстракции нуклеиновых кислот из пробы биоматериала, предназначен только для следующего этапа – для анализа уже выделенной пробы ДНК методом LAMP. Для пробоподготовки рекомендуется применять только зарегистрированные в РФ комплекты реагентов для экстракции нуклеиновых кислот.

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и LAMP в наборе реагентов предусмотрена одновременная амплификация целевой ДНК возбудителей ОКИ и внутреннего контрольного образца (ВКО). ВКО добавляется в каждый образец биологического материала на этапе экстракции ДНК. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования LAMP, и служит для исключения ложноотрицательных результатов исследования.

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

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования (с учетом повторяемости) была определена для набора реагентов в двух лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных образцов.

Испытания показали 100 % воспроизводимость и повторяемость результатов исследования.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики (чувствительность и специфичность) набора реагентов представлены в табл 3.

Таблица 3. Таблица диагностических характеристик набора реагентов «АмплиТест® ОКИ LAMP»

Показатель	Тип используемых образцов биологического материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
ДНК <i>Salmonella</i> spp.	Фекалии	92,60 – 100,00 %	98,23 – 100,00 %
ДНК <i>Shigella</i> spp. / энтероинвазивных <i>E.coli</i>		92,89 – 100,00 %	98,21 – 100,00 %
ДНК термофильных <i>Campylobacter</i> spp.		92,89 – 100,00 %	98,21- 100,00 %
ДНК аденовирусов группы F		92,89 – 100,00 %	98,21- 100,00 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней должны проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм 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.
- 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, упаковку³, 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

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г

привести к контаминации продуктами LAMP лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- 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 (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных 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. 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 плотно закрывающиеся или завинчивающиеся пробирки с крышками объемом 1,5 - 2,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

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

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

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

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

7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф

Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).

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. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов (ручная или автоматическая)

Ручная экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РФ (РУ № РЗН 2020/12985).

2. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РФ (РУ № РЗН 2022/19200).

Автоматическая экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РФ (РУ № РЗН 2022/19200).

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) 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) – при использовании прибора планшетного типа;

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

2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
4. Холодовой штатив (например, IsoFreeze PCR Rack, SSIbio («Сисиай Био»), США).
5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
7. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм («ДНК Технология», Россия).
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. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для исследования от пациента рекомендуется брать следующий биологический материал – фекалии.

Фекалии

Образцы забирают в стерильный горшок или подкладное судно. Затем в количестве 1 г (примерно) переносят в одноразовую герметичную емкость из полипропилена. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание - оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Фекалии

В микроцентрифужную пробирку (объемом 1,5 мл) вносят 0,9 мл фосфатного буфера (или стерильного физиологического раствора). В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии (10 %). Взвесь фекалий интенсивно встряхивают на вортексе до образования суспензии.

Центрифугируют суспензии фекалий 5 мин при 7000 g (10 тыс об/мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf). Супернатант (осветленный экстракт фекалий) в объеме 100 мкл используют для экстракции НК.

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 проводят в соответствии с Инструкциями по применению комплектов реагентов производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» и «АмплиТест РИБО-преп».

При использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» элюировать ДНК в **200 мкл Элюирующего буфера**.

При использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиТест РИБО-преп» элюировать ДНК в **150 мкл РНК-буфера**.

При экстракции ДНК используют отрицательный контрольный образец этапов экстракции и LAMP:

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

Перед выделением внести в каждую пробирку (с исследуемыми и контрольным образцами) по **10 мкл** внутреннего контрольного образца **ВКО IC-D2**.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – в течение 24 часов, при температуре не выше минус 16 °С в течение года.

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**.

Исследование проводится в двух пробирках с использованием двух различных LAMP-смесей (**LAMP-смесь-FL Shig-Camp** или **LAMP-смесь-FL Salm-Adeno**).

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционных смесей. На одну реакцию требуется **10 мкл** одной из **LAMP-смесей-FL**, **5 мкл LAMP-буфера-R2**, **1,0 мкл Bst** полимеразы **GTG**. Смеси готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением LAMP-исследования. Рекомендуется использовать холодовой штатив для пробирки, в которой смешивается реакционная смесь и пробирки с **Bst** полимеразой **GTG**.

2. Разморозить и перемешать содержимое всех реагентов LAMP-комплекта:

– содержимое пробирок со следующими реагентами: **LAMP-смесь-FL Shig-Camp**, **LAMP-смесь-FL Salm-Adeno** и

LAMP-буфер-R2 аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены, осадить капли на вортексе для всех пробирок;

– **Bst** полимеразу **GTG** аккуратно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. В двух отдельных пробирках приготовить реакционные смеси. Смешать необходимое количество: **LAMP-смеси-FL**, **LAMP-буфера-R2**, **Bst** полимеразы **GTG**, тщательно перемешать пипетированием и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для проведения LAMP ДНК исследуемых и контрольных проб, рекомендуется расставить в два ряда.

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

6. 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.

7. Поставить контрольные реакции на каждой смеси:

а) **положительный контроль LAMP (K+)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл K+ ОКИ-L**.

б) **отрицательный контроль LAMP (K-)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл K-**.

в) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

ВНИМАНИЕ! Провести LAMP сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы 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 (см. табл. 4).

Таблица 4 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для амплификаторов роторного⁴ и планшетного⁵ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	65	30 сек*/ 40 сек**	FAM, JOE (HEX), ROX	50

* для амплификаторов Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd.), Rotor-Gene Q (QIAGEN), CFX 96 (Bio-Rad)

** для амплификатора ДТпрайм (ДНК Технология)

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

ВНИМАНИЕ! При работе на приборах роторного типа выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции для пробирки со смесью LAMP-смесь-FL Shig-Camp.

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 3 каналам в соответствии с табл. 1 настоящей инструкции.

⁴ Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd.), Rotor-Gene Q (QIAGEN)

⁵ CFX 96 (Bio-Rad), 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)⁶ в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 5).

Таблица 5 — Принципы интерпретации результатов

LAMP- смесь- FL	Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора			Результат
	FAM	JOE (HEX)	ROX	
Shig-Camp	отсутствует или определено	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружена ДНК <i>Shigella spp.</i> / энтероинвазивных <i>E. coli</i> и термофильных <i>Campylobacter spp.</i>
	отсутствует или определено	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружена ДНК термофильных <i>Campylobacter spp.</i> , НЕ обнаружена ДНК <i>Shigella spp.</i> / энтероинвазивных <i>E. coli</i>
	отсутствует или определено	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Обнаружена ДНК <i>Shigella spp.</i> / энтероинвазивных <i>E. coli</i> , НЕ обнаружена ДНК термофильных <i>Campylobacter spp.</i>
	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружена ДНК <i>Shigella spp.</i> / энтероинвазивных <i>E. coli</i> и термофильных <i>Campylobacter spp.</i>
	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
	определено меньше граничного	определено больше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

⁶ При проведении изотермической реакции амплификации с детекцией в режиме «реального времени» цикл представляет собой условный цикл, в течение которого однократно определяется интенсивность флуоресцентного сигнала, отражающего накопление продукта амплификации, длительность цикла соответствует 30 секундам согласно заданной программе амплификации и детекции

LAMP- смесь- FL	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			Результат
	FAM	JOE (HEX)	ROX	
Salm-Adeno***	отсутствует или определено	<u>определено</u> меньше раничного	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i> и аденовирусов группы F
	отсутствует или определено	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i> , НЕ обнаружена ДНК аденовирусов группы F
	отсутствует или определено	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Обнаружена ДНК аденовирусов группы F, НЕ обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i>
	<u>определено</u> меньше граничного***	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружена ДНК <i>Salmonella spp.</i> и аденовирусов группы F
	отсутствует или определено больше граничного***	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
	<u>определено</u> меньше граничного***	определено больше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

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

** В случае получения **сомнительного результата** 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.

*** При интерпретации результатов, полученных для исследуемого образца на LAMP-смеси-FL Salm-Adeno, учитывается результат амплификации ВКО, полученный с LAMP-смесью-FL Shig-Camp для этого же исследуемого образца.

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

Результат исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 6 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 6 — Результаты для контролей различных этапов исследования

LAMP-смесь-FL	Контроль	Контролируемый этап LAMP-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		
			FAM	JOE (HEX)	ROX
Shig-Camp	OK	Экстракция ДНК, LAMP	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует
	K+	LAMP	не учитывается	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
	K–	LAMP	отсутствует	отсутствует	отсутствует
Salm-Adeno	OK	Экстракция ДНК, LAMP	не учитывается	отсутствует	отсутствует
	K+	LAMP		<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
	K–	LAMP		отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительных контролей LAMP (K+) для обеих LAMP-смесей-FL значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров JOE(HEX) и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить исследование для всех образцов с этапа LAMP.
2. Для отрицательных контролей LAMP (K–) на LAMP-смеси-FL Shig-Camp определено значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE(HEX) и/или ROX, для LAMP-смесь-FL Salm-Adeno определено значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров JOE(HEX) и/или ROX. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (OK) на одной или обеих реакционных смесях LAMP-смесей-FL определено значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофо-

ров JOE(HEX) и/или ROX. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе 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) на канале для флуорофора JOE/HEX и (или) ROX на одной из реакционных смесей LAMP-смесей-FL, 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 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.

Часть 1 в составе реагентов LAMP-смесь-FL Shig-Camp, LAMP-смесь-FL Salm-Adeno, LAMP-буфер-R2, *Bst* полимеразы GTG, К- хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Часть 2 в составе реагентов ОКО, ВКО IC-D2, К+ ОКИ-L, РНК-буфер, Элюирующий буфер хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. ОКО допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

LAMP-смесь-FL Shig-Camp, LAMP-смесь-FL Salm-Adeno хранить в защищенном от света месте.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты не более 3 раз.

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, Погодинская ул., дом 10 стр.1, e-mail: promlab@cspfmmba.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 регулирующую 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



Код партии



Содержимого достаточно
для проведения <n> тестов



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции
по применению или к
инструкции по приме-
нению в электронном виде



Температурный диапа-
зон



Не допускать воздействия
солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления