

«УТВЕРЖДАЮ»

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

Г.А.Шипулин

августа 2024 г.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**  
набора реагентов для выявления и количественного  
определения ДНК бактерий, вызывающих инфекции  
мочевыводящих путей – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterales* и *Enterococcus* spp. –  
методом ПЦР  
**«АмплиТест® ИМП»**



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

IVD

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАИМЕНОВАНИЕ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
Сведения об анализе .....	5
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	7
СОСТАВ .....	9
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	11
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	16
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ .....	17
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....	20
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	24
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	25
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....	26
ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	34
А. Подготовка проб для амплификации .....	34
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .....	35
В. Анализ и интерпретация результатов.....	36
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ .....	47
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	48
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ .....	49

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме «реального времени»
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент – количество ДНК бактерии, соответствующее 1 геному
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМП	- инфекции мочевыводящих путей
НК	- нуклеиновые кислоты
ПК	- положительный контроль экстракции и амплификации
МУ	- методические указания
ПКО	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К1 ИМП	- ДНК-калибратор ИМП в высокой концентрации
К2 ИМП	- ДНК-калибратор ИМП в средней концентрации
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
СОП № 46 ПКО ИМП	- стандартный образец предприятия № 46 «Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты ДНК <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriales</i> и <i>Enterococcus spp.</i> »
СОП № 48 ПКО ИМП-бакто	- стандартный образец предприятия № 48 «Положительный контрольный образец, содержащий смесь культур бактерий <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , и <i>Enterococcus spp.</i> »
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарно-эпидемиологические правила и нормы
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

## НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК бактерий, вызывающих инфекции мочевыводящих путей – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriales* и *Enterococcus spp.* – методом ПЦР «АмплиТест® ИМП» (далее – набор реагентов «АмплиТест® ИМП», набор реагентов).

## **НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов предназначен для выявления и количественного определения ДНК бактерий, вызывающих инфекции мочевыводящих путей – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterales* и *Enterococcus spp.* – в биологическом материале методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Биологическим материалом для проведения качественного и количественного анализа являются образцы мочи человека, для проведения качественного анализа - бактериальные культуры (чистые бактериальные культуры или смеси бактериальных культур), полученные путем бактериологического посева биоматериала человека (крови, аспиратов, мочи, экссудатов).

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

### **Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия**

Выявление ДНК бактерий, вызывающих инфекции мочевыводящих путей, методом ПЦР проводится пациентам с клиническими признаками инфекций мочевыводящих путей (пиелонефрита, цистита), интраабдоминальных инфекций, инфекций другой локализации, а также при диагностике бессимптомной бактериурии вне зависимости от возрастной категории и расовой принадлежности.

### **Область применения**

Клиническая лабораторная диагностика инфекций различной локализации, преимущественно инфекций мочевыводящих путей.

### **ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с клиническими и/или лабораторными признаками инфекций мочевыводящих путей, инфекций другой локализации, и от лиц, которым показано проведение исследования для выявления бессимптомной бактериурии.

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® ИМП» используется для выявления и количественного определения ДНК бактерий, вызывающих инфекции мочевыводящих путей (ИМП) – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriales* и *Enterococcus* spp. – в моче человека, для выявления ДНК указанных бактерий – в бактериальных культурах, полученных путем бактериологического посева биологического материала человека.

Определяемые условно-патогенные бактерии – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriales* и *Enterococcus* spp. – являются основными, наиболее распространенными возбудителями инфекций мочевыводящих путей и интраабдоминальных инфекций.

В зависимости от уровня поражения выделяют следующие формы ИМП: уросепсис, пиелонефрит, цистит, уретрит, бессимптомная бактериурия. Определение бессимптомной бактериурии имеет клиническое значение и показано для беременных и пациентов перед урологическими операциями.

В этиологии ИМП доминируют энтеробактерии (порядок *Enterobacterales*), среди них основной возбудитель - *Escherichia coli*. При внебольничных ИМП доля *E. coli* в этиологической структуре составляет 60-80 %. Следующий по частоте возбудитель - *Klebsiella pneumoniae*, вызывающая менее 20 % ИМП. Далее по частоте следуют *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. В этиологической структуре нозокомиальных инфекций, включая ИМП, лидирует *Klebsiella pneumoniae*, которая часто характеризуется устойчивостью к основным антимикробным препаратам.

Для микробиологической диагностики ИМП требуется как выявление уропатогенных бактерий, так и количественное определение их содержания. Количественное определение требуется для оценки диагностической значимости выявленной бактериурии, а также для оценки эффективности проводимой антимикробной терапии.

Согласно российским и европейским клиническим рекомендациям при диагностике ИМП клинически значимым считают содержание в моче бактерий, являющихся типичными возбудителями, в количестве, превышающем выбранный уровень, в зависимости от рассматриваемой формы ИМП:

- при остром неосложненном пиелонефрите – от  $10^4$  КОЕ/мл,
- при остром неосложненном цистите у женщин – от  $10^3$  КОЕ/мл,
- при бессимптомной бактериурии - от  $10^5$  КОЕ/мл (в 2 повторных анализах).

Список литературы:

1. Федеральные клинические рекомендации «Антимикробная терапия и профилактика инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов», 2017г.
2. Клинические рекомендации - Острый пиелонефрит – 2019, утв. МЗ РФ.
3. Guidelines on urological infections European Assotiation of Urology, 2024 (<http://www.uroweb.org/guidelines/>).
4. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В. и соавт., иссл. группа «ДАРМИС». Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018». Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019; 21 (2).
5. Абдоминальная хирургическая инфекция: Российские национальные рекомендации. Под ред. акад.РАН Б.Р. Гельфанда, акад. РАН А.И. Кириенко, проф.Н.Н. Хачатрян – 2-е изд. перераб. и доп. 2018.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип исследования основывается на выявлении и количественном определении ДНК бактерий, вызывающих инфекции мочевых путей (ИМП), с помощью мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Исследование включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию фрагментов ДНК определяемых микроорганизмов и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится в режиме «реального времени» (одновременно с амплификацией).

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала производится в соответствии с Инструкцией по применению в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО ИМП). ВКО ИМП позволяет контролировать все этапы исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты исследования. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации при помощи специфичных праймеров и фермента Таq-полимеразы с одновременной флуоресцентной детекцией при помощи специфичных флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. К олигонуклеотидным зондам, специфичным к различным ДНК-мишеням, прикреплены различные флуоресцентные метки. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации каждой ДНК-мишени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Результаты амплификации ДНК *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterales* и *Enterococcus* spp. регистрируются отдельно по четырем каналам флуоресцентной детекции. По каналу ROX детектируется продукт амплификации ВКО ИМП (внутреннего контрольного образца).

Количественная ПЦР в режиме «реального времени» проводится в двух пробирках. В пробирке с ПЦР-смесью-FL ИМП-1 проводится амплификация ДНК трех фрагментов генов мишеней *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas ae-*

*ruginosa* и фрагмента ДНК ВКО ИМП, в пробирке с ПЦР-смесью- FL ИМП-2 проводится амплификация ДНК двух фрагментов генов мишеней *Enterobacterales* и *Enterococcus* spp., а также фрагмента ДНК ВКО ИМП.

**Таблица 1 – Анализ результатов по каналам для флуорофоров**

Наименование ПЦР-смеси-FL	Канал для флуорофора	FAM	HEX	ROX	Cy5
ИМП-1	ДНК-мишень	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ВКО	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Область амплификации	фрагмент гена <i>uidA</i>	фрагмент гена <i>khe</i>	искусственно синтезированная последовательность	фрагмент гена <i>OprL</i>
ИМП-2	ДНК-мишень	<i>Enterobacterales</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	ВКО	-
	Область амплификации	Фрагмент гена 16S рРНК	фрагмент гена 16S рРНК	искусственно синтезированная последовательность	-

## КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов выпускается в двух формах комплектации.

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК Аллегро» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F.

**Форма 2** включает комплекты реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100, «БК-3-step» вариант 100 и «ПЦР-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 для дальнейшего 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 для дальнейшего 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 для дальнейшего исследования полученных образцов методом амплификации нуклеиновых кислот.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F предназначен для проведения амплификации фрагментов ДНК *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriales* и *Enterococcus* spp. методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов рассчитан на проведение 192 реакций амплификации (всего 96 тестов).

## КОМПЛЕКТНОСТЬ

- Набор реагентов «АмплиТест® ИМП»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

## 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
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 <sup>1</sup>	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

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

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F** – комплект реагентов для проведения амплификации фрагментов ДНК *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*,

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

*Enterobacterales* и *Enterococcus* spp. методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
<b>Часть 1</b>			
ПЦР-смесь-FL ИМП-1	Прозрачная жидкость от бесцветного до светлорозового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL ИМП-2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светлорозового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-F	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Тaq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
<b>Часть 2</b>			
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО ИМП	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО ИМП	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
К1 ИМП	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 ИМП	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 192 реакции 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 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® ИМП»**

Вид исследуемого материала	Комплект реагентов для экстракции ДНК	Выявляемые микроорганизмы	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Моча	«Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus spp</i>	$1 \times 10^3$
		<i>Enterobacterales</i>	$2 \times 10^3$
	«ДНК Аллегро» вариант 100	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus spp</i>	$2 \times 10^3$
		<i>Enterobacterales</i>	$4 \times 10^3$
Бактериальная культура	«ДНК Аллегро» вариант 100, «БК-3-step» вариант 100	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus spp</i>	$1 \times 10^6$
		<i>Enterobacterales</i>	$2 \times 10^6$

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

**Таблица 3 – Линейный диапазон измерений для количественного определения каждого из выявляемых микроорганизмов**

Вид исследуемого материала	ПЦР-смесь-FL	Выявляемые микроорганизмы	Линейный диапазон измерений (ГЭ/мл)
Моча	ИМП-1	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa</i>	$2 \times 10^3 - 2 \times 10^7$
		<i>Enterobacterales</i>	$4 \times 10^3 - 2 \times 10^7$
	ИМП-2	<i>Enterococcus spp.</i>	$2 \times 10^3 - 2 \times 10^7$

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК штаммов следующих микроорганизмов в концентрации не менее  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл: *Klebsiella pneumoniae*

ATCC 700603, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970, *Streptococcus agalactiae* ATCC 134197, 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 ингибирования ПЦР.

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

Для оценки потенциальной интерференции выбрали эндогенные (гемоглобин, креатинин, мочевины, альбумин) и экзогенные (тобрамицин, гепарин, триптиказо-соевый бульон) вещества, которые могут присутствовать в клинических образцах человека (моче) и бактериальных культурах (чистых бактериальных культурах или смеси бактериальных культур). Для изучения влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ) на полученные результаты испытываемым набором реагентов протестированы модельные образцы в присутствии и в отсутствии указанных выше эндогенных и экзогенных ПИВ.

Модельные образцы представляли собой образцы мочи, не содержавшие ДНК *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriales* и *Enterococcus spp.*,

контаминированные разведением СОП № 46 ПКО ИМП до концентрации  $4 \times 10^3$  ГЭ/мл, и бактериальную культуру *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, контаминированную разведением СОП № 46 до концентрации  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл.

**Таблица 4 – 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

### **Повторяемость, воспроизводимость, правильность**

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных образцов: положительных образцов, содержащих СОП № 48 ПКО ИМП-бакто с концентрациями  $4 \times 10^3$  ГЭ/мл,  $2 \times 10^3$  (в количественном и качественном формате),  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл (в качественном формате);  $1 \times 10^3$  (в качественном формате, при экстракции ДНК комплектом реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» (форма 2), не оценивается для *Enterobacteriales*), отрицательных образцов биологического материала при постоянных контролируемых переменных (в одной и той же лаборатории, одним оператором, в короткий промежуток времени, обеспечивающий неизменность условий эксперимента). Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 10 повторах, для оценки воспроизводимости в 30 повторах.

Определение повторяемости проводилось в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же амплификатора.

Определение воспроизводимости проводилось в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных амплификаторах.

По результатам тестирования подтверждена воспроизводимость и повторяемость результатов испытаний набора реагентов «АмплиТест® ИМП»:

- в качественном формате испытания показали 100 % воспроизводимость и повторяемость результатов исследования;
- в количественном формате коэффициент вариации CV значений Lg концентрации ДНК-мишени в условиях повторяемости и воспроизводимости (CVp и CVv) составил не более 4 %.

Правильность количественного определения содержания ДНК-мишеней с помощью набора реагентов была определена при тестировании разведения СОП № 46 ПКО ИМП в концентрации  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл, измеренной с помощью капельной цифровой ПЦР.

Величина систематической погрешности (В) составила не более 5,5 % (для каждой из ДНК-мишеней).

### **Прослеживаемость значений калибраторов ИМП**

Измерение значений калибраторов К1 ИМП и К2 ИМП проводится относительно контрольной серии калибраторов ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Концентрацию калибраторов контрольной серии определяют стандартизированной методикой измерения абсолютной концентрации контрольных образцов на основе генно-инженерных конструкций с использованием цифровой капельной ПЦР (ddPCR).

Коэффициент вариации измерений аттестованного значения логарифма концентрации калибраторов составляет не более 5 % (по каждой ДНК-мишени, с уровнем доверительной вероятности 95 %).

## 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® ИМП» и системой сравнения: набором реагентов «БакСкрин УПМ» по ТУ 21.20.23-084-464820-2018 производства «ДНК-технология», РФ, РУ № РЗН 2022/18191) и измерением концентрации ДНК определяемых бактерий в образцах мочи с помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR).

Результаты применения набора реагентов представлены в таблице 5.

Диагностические характеристики набора реагентов представлены в таблице 6.

**Таблица 5 – Результаты тестирования с помощью набора реагентов «АмплиТест® ИМП» и системой сравнения**

Вид исследуемого биоматериала (число образцов)	Выявляемая ДНК микроорганизма	Результаты применения набора реагентов	Результаты применения системы сравнения		
			Обнаружено (положительные)	Не обнаружено (отрицательные)	
Моча (124 образца)	<i>Escherichia coli</i>	Обнаружено	31	0	
		Не обнаружено	0	35	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Обнаружено	32	0	
		Не обнаружено	0	35	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Обнаружено	28	0	
		Не обнаружено	0	35	
	<i>Enterobacterales</i>	Обнаружено	60	0	
		Не обнаружено	0	35	
	<i>Enterococcus spp.</i>	Обнаружено	30	0	
		Не обнаружено	0	35	
	Бактериальные культуры (100 образцов)	<i>Escherichia coli</i>	Обнаружено	33	0
			Не обнаружено	0	67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Обнаружено	29	0	
		Не обнаружено	0	71	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Обнаружено	25	0	
		Не обнаружено	0	75	
<i>Enterobacterales</i>		Обнаружено	61	0	
		Не обнаружено	0	39	
<i>Enterococcus spp.</i>		Обнаружено	28	0	
		Не обнаружено	0	72	

**Таблица 6 – Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® ИМП»**

Вид исследуемого материала	Выявляемая ДНК микроорганизма	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Моча	<i>Escherichia coli</i>	88,8 -100 %	90,0 -100 %
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	89,1-100 %	90,0 -100 %
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87,7 -100 %	90,0 -100 %
	<i>Enterobacteriales</i>	94,0 - 100 %	90,0 - 100 %
	<i>Enterococcus spp.</i>	88,4 - 100 %	90,0 -100 %
Бактериальная культура	<i>Escherichia coli</i>	89,4 -100 %	94,6 - 100 %
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	88,1 -100 %	94,9 - 100 %
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86,3 -100 %	95,2 - 100 %
	<i>Enterobacteriales</i>	94,1 -100 %	91,0- 100 %
	<i>Enterococcus spp.</i>	87,7 - 100 %	95,0- 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:

- 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, упаковку<sup>2</sup>, 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 ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это

---

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

может привести к контаминации продуктами ПЦР 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 ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-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. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, 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; рН=7,5±0,2).

2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, 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, Ахуген, 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 плюс 2 до плюс 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. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2,0 мл (например, «Promega», США).

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

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

9. При использовании комплекта «БК-3-step» - одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся микропробирки или плотно закрывающиеся микропробирки с фиксатором крышки («safe lock») объемом 1,5 мл.

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

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

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

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

14. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

15. Емкость с дезинфицирующим раствором.

16. При использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» применяется автоматическая станция для экстракции НК (например, станция Auto-Pure 96 («Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd.», Китай), РУ № РЗН 2021/14263), зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:

– возможность реализации последовательности этапов экстракции в соответствии с данной Инструкцией;

– наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнитного сорбента;

– наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С;

– наличие системы перемешивания жидкостей шейкированием или пипетированием.

### **Полимеразная цепная реакция 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 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (Rotor-Gene 6000 (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), 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 с температурным режимом от плюс 2 до плюс 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**

Материалом для исследования служат:

- моча;
- бактериальная культура.

### **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, 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 осадки используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

Полученные после предварительной обработки осадки мочи ресуспендировать в 100 мкл ТС-Аллегро. 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 1 недели,
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

**Чистая бактериальная культура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала на жидкую или плотную питательные среды.**

Перенести от 0,1 до 0,25 мл посева с жидкой среды 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 250 мкл ТС-Аллегро (форма 1) или

**250 мкл 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 **250 мкл ТС-Аллегро** или **ЛР-3-step**. Полученную суспензию использовать для проведения экстракции ДНК. При использовании для экстракции ДНК комплекта «**ДНК Аллегро**» вариант **100** (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,
- амплификация ДНК с гибридизационно-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**» вариант **100** (форма 1) или «**Магно-Сорб-Комбо ТС**» вариант **100** (форма 2) в соответствии с Инструкцией по применению.

Экстракцию ДНК из образцов бактериальной культуры проводят с использованием комплекта реагентов «**ДНК Аллегро**»

**вариант 100**, входящего в состав формы 1, или «**БК-3-step**» **вариант 100**, входящего в состав формы 2 набора реагентов.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО ИМП**). В качестве отрицательного контроля экстракции 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**» **вариант 100** 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**» **вариант 100** или «**БК-3-step**» **вариант 100** 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» вариант 100**

1. Отобрать необходимое количество полипропиленовых пробирок, содержащих **ЛР-Аллегро** (включая отрицательный и положительный контроли выделения).

2. Осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.

3. Внести в пробирки с **ЛР-Аллегро** по **10 мкл ВКО ИМП**.

4. Используя отдельные наконечники с фильтром внести в пробирки с **ЛР-Аллегро** и **ВКО** по **30 мкл** подготовленной бактериальной суспензии или суспензии обработанного осадка мочи. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **30 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **30 мкл ПКО ИМП**, если он тестируется с данной партией образцов.

**ВНИМАНИЕ!** Постановку ПК необходимо проводить при изменении условий постановки или через каждые 6 месяцев использования одной серии наборов реагентов в одинаковых условиях. Под условиями постановки подразумеваются: изменение серии набора реагентов, способа экстракции ДНК, использование другого прибора для амплификации и детекции, изменение версии программного обеспечения прибора.

5. Плотнo закрыть крышки пробирок, содержимое пробирок тщательно перемешать на вортeксе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки, и инкубировать в предварительно разогретом до температуры **95 °С** термостате в течение **5 минут**.

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

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

8. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

**ВНИМАНИЕ!** Не допускать попадания белого осадка из **ЛР-Аллегро** в пробирки с ПЦР-смесью. Осадок может ингибировать ПЦР.

**Экстракция ДНК из бактериальных культур с использованием комплекта реагентов «БК-3-step» вариант 100**

1. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с фиксатором крышки типа «Safe Lock» для экстракции ДНК (включая отрицательный и положительный контроли выделения).

2. Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО ИМП**, добавить по **250 мкл ЛР-3-step**. Закрыть крышки, промаркировать пробирки.

3. В пробирки с **ЛР-3-step** и **ВКО** внести, используя отдельные наконечники с фильтром, по **20 мкл** подготовленной бактериальной суспензии. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) внести **20 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **20 мкл ПКО ИМП**.

**ВНИМАНИЕ!** Постановку ПК необходимо проводить при изменении условий постановки или через каждые 6 месяцев использования одной серии наборов реагентов в одинаковых условиях. Под условиями постановки подразумеваются: изме-

нение серии набора реагентов, способа экстракции ДНК, использование другого прибора для амплификации и детекции, изменение версии программного обеспечения прибора.

4. Плотнo закрыть крышки пробирок, содержимое пробирок тщательнo перемешать на вортeксе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки, и инкубировать в предварительно разогретом до температуры **95 °С** термостате в течение **5 минут**.

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

6. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

**ВНИМАНИЕ!** Не допускать попадания осадка в пробирки с ПЦР-смесью. Осадок может ингибировать ПЦР.

**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 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.

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

3. Внести в пробирки или лунки глубоколуночного планшета (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов по **40 мкл** подготовленной смеси **ВКО ИМП, буфера GT и Магнитного сорбента**.

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

5. Добавить в пробирки или лунки глубоколуночного планшета со смесью ВКО ИМП, буфера GT, магнитного сорбента и

Лизирующего буфера Комбо по **100 мкл исследуемых образцов**.

6. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **100 мкл ПКО ИМП** (если он тестируется с данной партией образцов).

**ВНИМАНИЕ!** Постановку ПК необходимо проводить при изменении условий постановки или через каждые 6 месяцев использования одной серии наборов реагентов в одинаковых условиях. Под условиями постановки подразумеваются: изменение серии набора реагентов, способа экстракции ДНК, использование другого прибора для амплификации и детекции, изменение версии программного обеспечения прибора.

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 для станций с магнитными стержнями 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 и контрольными образцами, полученными в соответствии с пунктом 6, на борт автоматической станции.

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

10. Для станций с магнитным штативом поместить пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в магнитный штатив на **1 мин**. Для станций с магнитными стержнями опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **1 мин**.

11. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **700 мкл Раствора для отмывки Комбо-1**. Для станций с магнитными стержнями 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. Повторить пункт 10.

14. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **500 мкл Раствора для отмывки Комбо-2**. Для станций с магнитными стержнями 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. Повторить пункт 10.

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 °С** в течение **5 мин**.

20. Для станций с магнитным штативом перенести раствор в чистые пробирки, не вынимая пробирки с магнитным сорбентом из магнитного штатива. Для станций с магнитными стержнями удалить магнитный сорбент из лунок планшета с помощью магнитных стержней.

Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

**ВНИМАНИЕ!** Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

## **Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100 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 ИМП, Буфер GT и Магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО ИМП, 10 мкл Буфера GT и 20 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО, буфера GT и магнитного сорбента.

5. Добавить в пробирки по **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**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **100 мкл ПКО ИМП** (если он тестируется с данной партией образцов).

**ВНИМАНИЕ!** Постановку ПК необходимо проводить при изменении условий постановки или через каждые 6 месяцев использования одной серии наборов реагентов в одинаковых условиях. Под условиями постановки подразумеваются: изменение серии набора реагентов, способа экстракции ДНК, использование другого прибора для амплификации и детекции, изменение версии программного обеспечения прибора.

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°C** 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.

**ВНИМАНИЕ!** Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

## **ПЦР 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 каждой реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-FL (ПЦР-смеси-FL ИМП-1 или ПЦР-смеси-FL ИМП-2), 5 мкл ПЦР-буфера-Ф, 0,5 мкл Таq полимеразы. 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 ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирки с ПЦР-смесями-FL, ПЦР-буфером-Ф. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

В двух отдельных пробирках приготовить 2 реакционные смеси. Смешать необходимое количество: ПЦР-смеси-FL, ПЦР-буфера-Ф, Таq полимеразы, перемешать смесь на вортексе, осадить капли на вортексе.

3. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для ПЦР 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 утилизировать.

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

6. Поставить контрольные реакции на каждой смеси:

- **Калибратор К1** – в две<sup>3</sup> пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К1 ИМП**.

- **Калибратор К2** – в две<sup>3</sup> пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К2 ИМП** (калибратор К2 не используется при проведении качественного анализа).

- **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К-**.

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

- **положительный контроль экстракции (ПК<sup>4</sup>)** – в пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл пробы, экстрагированной из ПКО ИМП**.

**ВНИМАНИЕ!** Провести ПЦР после соединения реакционных смесей, ДНК-проб и контролей.

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

1. При использовании программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (далее – ПО «FRT Manager») (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870) постановка ПЦР-РВ осуществляется согласно руководству пользователя к указанному ПО и методическим рекомендациям по проведению амплификации и анализу результатов при помощи ПО «FRT Manager».

В случае запуска постановки с помощью ПО амплификатора необходимо запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7 и вкладыш, прилагаемый к

<sup>3</sup> Допускается поставить по одной пробирке калибраторов К1 и К2 в постановку

<sup>4</sup> если он тестируется с данной партией образцов

данному набору реагентов).

**Таблица 7 – Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного<sup>5</sup> и планшетного<sup>6</sup> типа**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	10 сек	-	45
	60	20 сек	FAM (Green); HEX (JOE, Yellow, VIC); ROX (Orange); Cy5 (Red)	
	72	10 сек	-	

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

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 с помощью ПО «FRT Manager» или ПО амплификатора.

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

## **В. Анализ и интерпретация результатов**

При использовании для запуска постановки ПО «FRT Manager» анализ полученных данных и интерпретация результатов проводятся автоматически.

<sup>5</sup> Rotor-Gene 6000 (QIAGEN), Rotor-Gene Q (QIAGEN).

<sup>6</sup> CFX 96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Thermo Scientific), ДТпрайм (ДНК Технология, Россия).

При работе с ПО амплификатора, анализ полученных данных проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют графики накопления флуоресцентного сигнала по 4 каналам для ПЦР-смеси-FL ИМП-1 и по 3 каналам для ПЦР-смеси-FL ИМП-2 в соответствии с табл. 1 настоящей инструкции.

**Для ПЦР-смеси-FL ИМП-1:**

– по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Escherichia coli*;

– по каналу для флуорофора HEX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Klebsiella pneumoniae*;

– по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО;

– по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Pseudomonas aeruginosa*;

**Для ПЦР-смеси-FL ИМП-2:**

– по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Enterobacterales*;

– по каналу для флуорофора HEX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Enterococcus* spp.

– по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО;

– данные по каналу Cy5 не учитываются.

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линии (указан во вкладыше к набору реагентов), что определяет наличие или отсутствие значения порогового цикла  $C_t$  для данной пробы ДНК. При количественном анализе на основе полученного значения порогового цикла  $C_t$  для данной пробы ДНК и значений

St для калибраторов K1 и K2 ПО автоматически рассчитывает концентрацию ДНК соответствующего микроорганизма в пробе ДНК.

Сначала анализируют результаты, полученные для контрольных образцов. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 8 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

**Таблица 8 – Результаты для контролей различных этапов исследования**

ПЦР- смесь-FL	Контроль	Контролируе- мый этап ПЦР исследований	Значение порогового цикла (Ct) для флуорофора			
			FAM (Green)	HEX (JOE, VIC, Yel- low)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
ИМП-1	ОК	Экстракция ДНК и ПЦР	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Определено меньше граничного	Отсутствует или определено больше граничного
	К-	ПЦР	Отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
	К1	ПЦР	Определено меньше граничного	Определено меньше граничного	Не учитывается	Определено меньше граничного
	К2	ПЦР	Определено меньше граничного	Определено меньше граничного	Не учитывается	Определено меньше граничного
	ОК	Экстракция ДНК и ПЦР	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Определено меньше граничного	Не учитывается
ИМП-2	К-	ПЦР	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	отсутствует	Не учитывается
	К1	ПЦР	Определено меньше граничного	Определено меньше граничного	Не учитывается	Не учитывается
	К2	ПЦР	Определено меньше граничного	Определено меньше граничного	Не учитывается	Не учитывается

**Внимание!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к набору реагентов.

## Качественный и количественный анализ для образцов мочи

Для получения количественного результата необходимо предварительно ввести в ПО значение концентрации каждого из калибраторов K1 и K2 (по каналам для флуорофоров FAM, JOE и Cy5), указанное во вкладыше к набору реагентов, и выбрать единицы измерения «ГЭ/мл». На основании полученных значений порогового цикла ( $C_t$ ) и заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 по каждому каналу (кроме канала для детекции результатов по ВКО - ROX) происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет концентрации ДНК соответствующей ДНК-мишени в пробе ДНК в единицах измерения «ГЭ/мл».

**ВНИМАНИЕ!** Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Полученная калибровочная прямая (график стандартов) должна соответствовать следующим критериям:

- 1) Коэффициент корреляции  $R^2$  не менее 0,97;
- 2) Эффективность ПЦР находится в диапазоне 87 – 110% (0,87 – 1,1).

Несоблюдение получения правильных результатов для контрольных образцов и требований к калибровочной прямой может привести к недостоверным результатам ПЦР-исследования анализируемых образцов.

Для определения количества ДНК каждого из определяемых микроорганизмов в образце мочи (количество геномных эквивалентов в 1 мл мочи) необходимо произвести расчет по следующей формуле:

$$\begin{aligned} & \text{Число геномных эквивалентов в 1 мл образца мочи} = \\ & = K \times [\text{число геномных эквивалентов в 1 мл пробы ДНК}]. \end{aligned}$$

При экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «ДНК-Аллегро» вариант 100 (при использовании формы 1), коэффициент  $K = 1$ .

При экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТС» вариант 100 (при использовании формы 2), коэффициент  $K = 0,2$ .

Общий результат для образца включает перечисление результатов, которые учитываются по каждому из пяти определяемых микроорганизмов и групп микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterales*, *Enterococcus* spp.):

1) ДНК *Escherichia coli* детектируется по каналу FAM в реакции с ПЦР-смесью ИМП-1. Если по этому каналу определено значение концентрации ДНК, и значение порогового цикла Ct не превышает граничное, результат: **обнаружена ДНК *Escherichia coli***, указывается количество ДНК (рассчитанное значение количества ДНК в 1 мл образца мочи). Если значение порогового цикла Ct по каналу FAM отсутствует или превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Escherichia coli***.

2) ДНК *Klebsiella pneumoniae* детектируется по каналу HEX в реакции с ПЦР-смесью ИМП-1. Если по этому каналу определено значение концентрации ДНК, и значение порогового цикла Ct не превышает граничное, результат: обнаружена ДНК *Klebsiella pneumoniae*, указывается количество ДНК (рассчитанное значение количества ДНК в 1 мл образца мочи). Если значение порогового цикла Ct по каналу HEX отсутствует или превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Klebsiella pneumoniae***.

3) ДНК *Pseudomonas aeruginosa* детектируется по каналу для флуорофора Cy5 в реакции с ПЦР-смесью ИМП-1. Если по этому каналу определено значение концентрации ДНК, и значение порогового цикла Ct не превышает граничное, результат: **обнаружена ДНК *Pseudomonas aeruginosa***, указывается количество ДНК (рассчитанное значение количества ДНК в 1 мл образца мочи). Если значение порогового цикла Ct по каналу Cy5 отсутствует или превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Pseudomonas aeruginosa***.

4) ДНК *Enterobacterales* детектируется по каналу FAM в реакции с ПЦР-смесью ИМП-2. Если по этому каналу определено значение концентрации ДНК и рассчитанное значение количества ДНК в 1 мл образца мочи составляет не менее  $1 \times 10^3$  ГЭ/мл, результат: **обнаружена ДНК *Enterobacterales***, указывается количество ДНК (рассчитанное значение количества

ДНК в 1 мл образца мочи). Если получено значение менее  $2 \times 10^3$  ГЭ/мл (или отсутствует значение концентрации по каналу FAM), результат: **не обнаружено ДНК *Enterobacterales***.

5) ДНК *Enterococcus spp.* детектируется по каналу HEX в реакции с ПЦР-смесью ИМП-2. Если по этому каналу определено значение концентрации ДНК, и значение порогового цикла Ct не превышает граничное, результат: **обнаружена ДНК *Enterococcus spp.***, указывается количество ДНК (рассчитанное значение количества ДНК в 1 мл образца мочи). Если значение порогового цикла Ct по каналу Cy5 отсутствует или превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Enterococcus spp.***

Количество ДНК для *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus spp.* учитывается в диапазоне концентраций  $2 \times 10^3 - 2 \times 10^7$  ГЭ/мл (линейный диапазон). Если полученное значение количества ДНК для этих микроорганизмов составляет менее  $2 \times 10^3$  ГЭ/мл, то указывается «менее  $2 \times 10^3$  ГЭ/мл». Если полученное значение составляет более  $2 \times 10^7$  ГЭ/мл, указывается «более  $2 \times 10^7$  ГЭ/мл».

Количество ДНК *Enterobacterales* учитывается в диапазоне концентраций  $4 \times 10^3 - 2 \times 10^7$  ГЭ/мл. Если полученное значение составляет более  $2 \times 10^7$  ГЭ/мл, то указывается результат «более  $2 \times 10^7$  ГЭ/мл». Если полученное значение составляет от  $1 \times 10^3$  ГЭ/мл до  $4 \times 10^3$  ГЭ/мл, то указывается результат «менее  $4 \times 10^3$  ГЭ/мл».

Если значение Ct по каналу для флуорофора ROX, используемому для детекции ВКО, отсутствует или превышает граничное значение по результатам реакции с ПЦР-смесью ИМП-1, и для каждого из 3 определяемых микроорганизмов получен результат «не обнаружено» или определено количество «менее  $2 \times 10^3$  ГЭ/мл», то **результат невалидный**. Если значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, отсутствует или превышает граничное значение по результатам реакции с ПЦР-смесью ИМП-2, и для ДНК *Enterobacterales* и ДНК *Enterococcus spp.* получен результат «не обнаружено» или количество ДНК «менее  $4 \times 10^3$  ГЭ/мл» (для *Enterobacterales*), или «менее  $2 \times 10^3$  ГЭ/мл» (для *Enterococcus spp.*), то **результат невалидный**. В случае получения невалидного результата

необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения ДНК.

Контрольный образец ПКО ИМП тестируется однократно при получении новой серии набора реагентов при проведении количественного анализа (с первой партией образцов). Также можно тестировать ПКО повторно как дополнительный контроль для оценки правильности полученных количественных результатов. Количество ДНК каждого из определяемых микроорганизмов в образце ПКО должно находиться в диапазоне, указанном во вкладыше.

### Качественный анализ для образцов бактериальных культур

Общий результат для образца включает перечисление результатов, которые учитываются по каждому из определяемых микроорганизмов и групп микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriales*, *Enterococcus* spp.):

1) ДНК *Escherichia coli* детектируется по каналу FAM в реакции с ПЦР-смесью ИМП-1. Если по этому каналу определено значение порогового цикла Ct менее граничного значения C1, результат: **обнаружена ДНК *Escherichia coli***. Если значение Ct по каналу FAM отсутствует или превышает граничное значение C2, а значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, не превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Escherichia coli***. Если получено значение Ct по каналу FAM от C1 до C2, результат **сомнительный** (требуется повторный анализ образца).

2) ДНК *Klebsiella pneumoniae* детектируется по каналу HEX в реакции с ПЦР-смесью ИМП-1. Если по этому каналу определено значение порогового цикла Ct менее граничного значения C1, результат: **обнаружена ДНК *Klebsiella pneumoniae***. Если значение Ct по каналу HEX отсутствует или превышает граничное значение C2, а значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, не превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Klebsiella pneumoniae***. Если получено значение Ct по каналу HEX от C1 до C2, результат **сомнительный** (требуется повторный анализ образца).

3) ДНК *Pseudomonas aeruginosa* детектируется по каналу для флуорофора Cy5 в реакции с ПЦР-смесью ИМП-1. Если по этому каналу определено значение порогового цикла Ct менее граничного значения C1, результат: **обнаружена ДНК *Pseudomonas aeruginosa***. Если значение Ct по каналу Cy5 отсутствует или превышает граничное значение C2, а значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, не превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Pseudomonas aeruginosa***. Если получено значение Ct по каналу Cy5 от C1 до C2, результат **сомнительный** (требуется повторный анализ образца).

4) ДНК *Enterobacteriales* детектируется по каналу FAM в реакции с ПЦР-смесью ИМП-2. Если по этому каналу определено значение порогового цикла Ct менее граничного значения C1, результат: **обнаружена ДНК *Enterobacteriales***. Если значение Ct по каналу FAM отсутствует или превышает граничное значение C2, а значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, не превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Enterobacteriales***. Если получено значение Ct по каналу FAM от C1 до C2, результат **сомнительный** (требуется повторный анализ образца).

5) ДНК *Enterococcus spp.* детектируется по каналу HEX в реакции с ПЦР-смесью ИМП-2. Если по этому каналу определено значение порогового цикла Ct менее граничного значения C1, результат: **обнаружена ДНК *Enterococcus spp.*** Если значение Ct по каналу HEX отсутствует или превышает граничное значение C2, а значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, не превышает граничное значение, результат: **не обнаружено ДНК *Enterococcus spp.*** Если получено значение Ct по каналу HEX от C1 до C2, результат **сомнительный** (требуется повторный анализ образца)

Если значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, отсутствует или превышает граничное значение по результатам реакции с ПЦР-смесью ИМП-1, и значения Ct по каналам FAM, HEX и Cy5 отсутствуют или превышают граничные значения C1, результат **невалидный**. Если значение Ct по каналу ROX, используемому для детекции ВКО, отсут-

ствуется или превышает граничное значение по результатам реакции с ПЦР-смесью ИМП-2, и значения  $C_t$  по каналам FAM и HEX отсутствуют или превышают граничные значения  $C_1$ , результат невалидный.

В случае получения невалидного результата или сомнительного результата необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения ДНК.

#### **Возможные ошибки:**

1. Для калибраторов K1 ИМП или/и K2 ИМП значение  $C_t$  по каналам для флуорофоров FAM и/или HEX, и/или Cy5 для ПЦР-смеси ИМП-1, и/или по каналам для флуорофоров FAM и/или HEX для ПЦР-смеси ИМП-2 отсутствует или превышает указанное граничное значение. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов.

2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) определено значение порогового цикла ( $C_t$ ) менее граничного по одному или нескольким каналам. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-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 HEX, и/или Cy5 для ПЦР-смеси ИМП-1, или определено значение  $C_t$  менее граничного по каналу для флуорофора FAM для ПЦР-смеси ИМП-1, и/или по каналу для флуорофора FAM и/или HEX для ПЦР-смеси ИМП-2. 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 ПЦР-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 ПЦР-исследование для этого образца.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 12 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 «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F: Часть 1 в составе реагентов ПЦР-смесь-FL ИМП-1, ПЦР-смесь-FL ИМП-2, ПЦР-буфер-F, Taq полимераза, К- хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ИМП-1 и ИМП-2 хранить в защищенном от света месте. К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Часть 2 в составе реагентов ОКО, ВКО ИМП, ПКО ИМП, К1 ИМП и К2 ИМП 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@cspfmbs.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 применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Знаки опасности