

«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

2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления ДНК микобактерий

туберкулезного комплекса методом

изотермической петлевой амплификации

«АмплиТест® МБТ-LAMP»



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАИМЕНОВАНИЕ.....	4
НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
Область применения.....	4
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	4
Потенциальные пользователи.....	5
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ	6
СОСТАВ	7
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	10
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	13
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	17
Предварительная подготовка исследуемого материала	18
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	22
ПРОВЕДЕНИЕ LAMP-ИССЛЕДОВАНИЯ	24
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	24
ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	25
А. Подготовка проб для амплификации.....	25
А1. Подготовка проб для амплификации при использовании «LAMP-комплекта» вариант FRT-100 F (форма 1 и 2).....	25
А2. Подготовка проб для амплификации при использовании «LAMP-комплекта» вариант FRT-96 L (форма 3 и 4).....	27
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	28
В. Анализ и интерпретация результатов	29
Критерии отбора проб ДНК, пригодных для анализа с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1»	32
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	33
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	35
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100	37
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 на автоматической станции с магнитными стержнями.....	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхоальвеолярный лаваж
<i>Bst</i>	- <i>Bacillus stearothermophilus</i>
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент – количество ДНК-мишени, соответствующее одному геному микобактерии туберкулеза
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К–	- отрицательный контроль LAMP
КОЕ	- колониеобразующие единицы
МБТ	- микобактерии туберкулезного комплекса, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
МУ	- методические указания
НТМБ	- нетуберкулезные микобактерии
ОК	- отрицательный контроль экстракции и LAMP
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
ПК	- положительный контроль экстракции и LAMP
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПО «FRT Manager»	- программное обеспечение для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870)
РУ	- регистрационное удостоверение
РФ	- Российская Федерация
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»
LAMP	- изотермическая петлевая амплификация (loop-mediated amplification)
NALC-NaOH	- N-ацетил-L-цистеин (NALC) и раствор гидроксида натрия (NaOH), используются для предварительной обработки биологического материала
PBS	- фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline)

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом изотермической петлевой амплификации «АмплиТест® МБТ-LAMP» (далее – набор реагентов «АмплиТест® МБТ-LAMP»).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для качественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса – *Mycobacterium tuberculosis complex* (включает *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*) в образцах биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), биоптата (операционного материала), мочи) и бактериальных культурах методом изотермической петлевой амплификации.

Функциональное назначение – для диагностики туберкулеза *in vitro*.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Используется при обследовании больных туберкулезом и подозрительных на туберкулез лиц вне зависимости от их половой, возрастной категории и расовой принадлежности.

Область применения

Клиническая лабораторная диагностика.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется в комплексе с другими методами обследования больных туберкулезом и подозрительных на туберкулез лиц с целью быстрого выявления возбудителя туберкулеза и своевременного назначения противотуберкулезной терапии.

Противопоказания 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

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 исследования основывается на определении фрагментов генов *Mycobacterium tuberculosis complex* методом изотермической петлевой амплификации (LAMP) с флуоресцентной детекцией. Процедура анализа включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала и проведение изотермической петлевой амплификации (LAMP) фрагментов выявляемых генов-мишеней с флуоресцентной детекцией с помощью мишень-специфичного флуоресцентно-меченого праймера с детекцией в режиме «реального времени».

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала производится в соответствии с инструкцией по применению в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-Mix). ВКО необходим для контроля этапа экстракции каждого образца и оценки влияния потенциальных ингибиторов на результат исследования, что позволяет исключить ложноотрицательный результат.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится изотермическая амплификация участков ДНК при помощи специфичных праймеров и фермента *Bst* полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые праймеры, связанные с олигонуклеотидом с гасителем, которые связываются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, встраиваются в один из продук-

тов 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».

На этапе LAMP в одной пробирке одновременно проводятся три реакции: амплификация специфических для *M. tuberculosis* complex многокопийной мишени IS6110 (качественное обнаружение ДНК МБТ) и однокопийной мишени *mpb64* (качественное обнаружение ДНК МБТ; отбор проб, пригодных к анализу с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1»), а также амплификация ДНК ВКО. Результаты амплификации анализируемых фрагментов генов и ДНК ВКО регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1):

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
Детектируемая ДНК-мишень	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex	ДНК ВКО	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
Область амплификации	участок гена IS6110	искусственно синтезированная последовательность	участок гена <i>mpb64</i>

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ

Набор реагентов выпускается в четырех формах комплектации.

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и «LAMP-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и «LAMP-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и «LAMP-комплект» вариант FRT-96 L.

Форма 4 включает комплекты реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и «LAMP-комплект» вариант FRT-96 L.

Все формы комплектации набора реагентов предназначены для выполнения полного LAMP-исследования, включающего экстракцию ДНК и проведение изотермической амплификации с детекцией в режиме «реального времени».

Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 предназначен для выделения РНК/ДНК из анализируемых образцов вручную, комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 – для автоматического выделения РНК/ДНК.

Составной частью форм 1 и 2 является «LAMP-комплект» вариант FRT-100 F, который содержит все реагенты в жидком виде и предназначен для использования всех типов рекомендованных амплификаторов.

Составной частью форм 3 и 4 является «LAMP-комплект» вариант FRT-96 L, который содержит реакционную смесь в лиофилизированном виде и предназначен для приборов только планшетного типа (CFX96, ДТпрайм, QuantStudio 5).

Набор реагентов форм 1 и 2 рассчитан на анализ 100 образцов, включая контроли.

Набор реагентов форм 3 и 4 рассчитан на анализ 96 образцов, включая контроли.

Комплектность:

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

СОСТАВ

«РИБО-преп ТБ» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала человека и бактериальных культур – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ¹	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	2 флакона
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон

К комплекту реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 предлагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО ДНК МБТ-LAMP	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка
ВКО-Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав форм 1 и 3.

«Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала человека и бактериальных культур – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий буфер Комбо	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ¹	50	1 флакон
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	1	2 пробирки
Раствор для отмывки Комбо-1	Прозрачная бесцветная жидкость	70	1 флакон
Раствор для отмывки Комбо-2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон

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

К комплекту реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО ДНК МБТ-LAMP	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка
ВКО-Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 2 и 4.

«LAMP-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для изотермической амплификации фрагментов ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
LAMP-смесь-FL МБТ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
LAMP-буфер-AMR	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Bst полимеразы AMR	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов «LAMP-комплект» вариант FRT-100 F рассчитан на амплификацию 100 образцов, включая контроли. Входит в состав форм 1 и 2.

«LAMP-комплект» вариант FRT-96 L – комплект реагентов с лиофилизированной реакционной смесью для изотермической амплификации фрагментов ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo	Гранула белого цвета	-	1 стрип из 8 пробирок x 12
Растворитель LAMP- Lyo	Прозрачная бесцветная жидкость	1,1	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм 3 и 4.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для всех форм набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

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

Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл	
	мишень IS6110 (канал JOE (HEX, VIC, Yellow))	мишень <i>mpb64</i> (канал Cy5 (Red))
Мокрота, БАЛ, биоптат (операционный материал), моча, бактериальная культура	1×10^2	1×10^3

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 штаммов следующих микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 КОЕ/мл: *Mycobacterium tuberculosis* complex – *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra № 700404 и *Mycobacterium bovis* Vallee № 700203 (из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) – *Mycobacterium avium* № 700758, *Mycobacterium kansasii* № 700700, *Mycobacterium fortuitum*

№ 700711 (из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); клинических штаммов НТМБ – *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. abscessus*, *M. malmoense*; других бактерий, не относящихся к роду *Mycobacterium*, – *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33862, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 700324, *Haemophilus influenza* ATCC® 33930, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734 (из коллекции American Type Culture Collection® (ATCC®), США), а также препарата геномной ДНК человека № D7011 («Sigma-Aldrich», США).

Для штаммов *M. tuberculosis* H37Ra и *M. bovis* Vallee получен результат «Обнаружена ДНК *M. tuberculosis* complex». Во всех остальных случаях получен результат «Не обнаружена ДНК *M. tuberculosis* complex», т.е. неспецифических положительных результатов выявлено не было.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Интерферирующие вещества могут как находиться в образце биологического материала, так и попасть в него на этапе пробоподготовки. Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрена одновременная амплификация фрагментов ДНК МБТ и внутреннего контрольного образца (ВКО). ВКО добавляется в каждый анализируемый образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования амплификации.

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

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции выбраны эндогенные (муцин, гемоглобин, билирубин, триглицериды, креатинин, мочеви́на, моче́вая кислота) и экзогенные (лидокаин, дексаметазон, тобрамицин, гепарин) вещества, которые могут присутствовать в исследуемом образце биологического материала (мокрота, БАЛ, биоптаты (операционный материал), моча). Для изучения влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ) на полученные результаты испытываемым набором реагентов протестированы модельные образцы в присутствии и в отсутствие указанных выше эндогенных и экзогенных ПИВ. Модельные образцы представляли собой образцы мокроты, БАЛ, биоптата (операционный материал), мочи, не содержавшие ДНК МБТ, контаминированные разведением штамма *M. tuberculosis* H37Ra до конечной концентрации 1×10^3 ГЭ/мл, с добавлением эндогенных и экзогенных ПИВ (испытываемые образцы) и без добавления данных веществ (контрольные образцы). Вычисляли разницу полученных средних значений порогового цикла Ct (ΔCt_{cp}) по каналам для флуорофоров JOE/HEX и Cy5. При значении ΔCt_{cp} менее 2,5 циклов делали вывод об отсутствии влияния потенциально интерферирующих веществ на результат LAMP. Результаты оценки представлены в табл. 3.

Таблица 3 — Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ

Материал	Вид ПИВ	Потенциальный интерферент	Концентрация в образце	Наличие интерферирующего эффекта
Мокрота, БАЛ	Эндогенные вещества	Муцин	2 мг/дл	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Лидокаин	51,2 ммоль/л	Не обнаружено
		Дексаметазон	1,53 ммоль/л	Не обнаружено
Биоптаты	Эндогенные вещества	Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
		Билирубин	20 мг/дл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Гепарин	3000 Ед/л	Не обнаружено
Моча	Эндогенные вещества	Мочевина	4,8 г/дл	Не обнаружено
		Креатинин	5 мг/дл	Не обнаружено
		Мочевая кислота	9 мг/дл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Тобрамицин	51,4 ммоль/л	Не обнаружено
		Лидокаин	51,2 ммоль/л	Не обнаружено

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 с доверительной вероятностью 95 % определены на основании результатов клинических испытаний относительно набора сравнения – набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838).

Результаты клинических испытаний набора реагентов представлены в табл. 4, диагностические показатели набора – в табл. 5.

Таблица 4 – Результаты тестирования набора реагентов «АмплиТест® МБТ-LAMP» и набора сравнения

Вид исследуемого материала	Результаты применения набора реагентов	Результаты применения набора сравнения	
		Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)
Мокрота	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	55	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	55
БАЛ	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	60	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	50
Биоптат (операционный материал)	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	95	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	50

Вид исследуемого материала	Результаты применения набора реагентов	Результаты применения набора сравнения	
		Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)
Моча	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	51	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	55
Бактериальная культура	Обнаружена ДНК МБТ (положительные)	50	0
	Не обнаружена ДНК МБТ (отрицательные)	0	50

Таблица 5 – Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® МБТ-LAMP»

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)
Мокрота	100 % (93,51-100 %)	100 % (93,51-100 %)
БАЛ	100 % (94,04-100 %)	100 % (92,89-100 %)
Биоптат (операционный материал)	100 % (96,19-100 %)	100 % (92,89-100 %)
Моча	100 % (93,02-100 %)	100 % (93,51-100 %)
Бактериальная культура	100 % (92,89-100 %)	100 % (92,89-100 %)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 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» и методических указаний МУ 1.3.2569-

² Диагностическая чувствительность относительно использованного набора сравнения.

³ Диагностическая специфичность относительно использованного набора сравнения.

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:

- Соблюдать температуру в помещении лаборатории от плюс 20 до плюс 28 °С и относительную влажность воздуха от 15 до 75 %.

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

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

- Во время работы с образцами на этапах их взятия, предварительной обработки и экстракции ДНК использовать противочумные костюмы IV типа (или аналоги), респираторы 3-го класса защиты FFP3, одноразовые шапочки, очки и одноразовые перчатки.

- 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, упаковку⁴, 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

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтрами. Одноразовые пластиковые расходные материалы (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 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 транспортирования, 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. Контейнеры пластиковые для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-100 мл, стерильные (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия).
2. Одноразовые полипропиленовые пробирки с коническим дном объемом 15 и 50 мл.
3. Одноразовые пипетки Пастера.
4. Петли бактериологические 1 мкл, стерильные (например, «Пласти Лаб», Ливан).
5. 0,9% раствор натрия хлорида стерильный (стерильный

- физиологический раствор).
6. Противочумный костюм IV типа (или аналог), респиратор 3-го класса защиты FFP3 (например, «НЕВА®-306» без клапана выдоха, Россия), шапочка, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 7. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Реагенты для деkontаминации и гомогенизации образцов биологического материала человека методом NALC-NaOH, включающие стерильные растворы гидроксида натрия (NaOH), цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), фосфатного буфера pH 6,8 и N-ацетил-L-цистеин (NALC).
2. Раствор натрия хлорида 0,9 % (стерильный физиологический раствор).
3. Одноразовые пипетки Пастера.
4. Штативы для пробирок объемом 15 и 50 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
5. Центрифуга для пробирок объемом 15 и 50 мл.
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
7. Автоматический дозатор переменного объема до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
8. Гомогенизатор (например, Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай) (для биоптатов).
9. Стерильные стеклянные бусы (для бактериальных культур и биоптатов).
10. Стандарт мутности McFarland № 0,5, 1 или 2 (для бактериальных культур).
11. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
12. Противочумный костюм IV типа (или аналог), респиратор 3-го класса защиты FFP3 (например, «НЕВА®-306» без клапана выдоха, Россия), шапочка, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. 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. При использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» для автоматического выделения РНК/ДНК требуется станция для экстракции НК (например, процессор магнитных частиц KingFisher Flex 96 («Thermo Fisher Scientific», США), 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.
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», Россия).
7. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема до 100, до 200, до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
8. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл с защелкой (например, «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного

объема с аэрозольным барьером до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).

10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Планшеты глубоколоночные на 96 лунок для автоматической станции выделения (например, «Allsheng», Китай).
12. Гребенки наконечников для магнитных стержней автоматической станции выделения (например, «Allsheng», Китай).
13. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
14. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
15. Противочумный костюм IV типа (или аналог), респиратор 3-го класса защиты FFP3 (например, «НЕВА®-306» без клапана выдоха, Россия), шапочка, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
16. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Изотермическая амплификация с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «LAMP-комплект» вариант FRT-100 F:
 - закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 0,6 мл (например, Ахуген, 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, Ахуген, 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) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10, до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
 6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (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 (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киарен ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd. («Лайф Текнолоджис Холдингс Птс. Лтд»), Сингапур).
 8. Программное обеспечение для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ООО «ИЛС», Россия; РУ № РЗН 2019/8870).
 9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 10. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

11. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования при использовании набора реагентов «АмплиТест® МБТ-LAMP» являются образцы биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи), бактериальные культуры.

Взятие материала

БАЛ, мокроту, мочу (среднюю порцию), биоптаты (операционный материал) собирают в стерильные одноразовые градуированные плотно закручивающиеся емкости из полипропилена объемом 20-100 мл с широким горлом так, как описано в Приказе Минздрава России от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации (с изменениями на 5 июня 2017 года)» Приложение № 11 II. **ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ**
2.1. Сбор диагностического материала.

ВНИМАНИЕ! Диагностический материал, подлежащий в дальнейшем культуральному исследованию, не должен храниться в холодильнике (4 – 8 °С) более 48 – 72 часов без применения консервирующих средств.

Бактериальные культуры, выросшие:

1) на плотной питательной среде: переносят колонии в стеклянные пробирки, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl);

2) в жидкой питательной среде: используют оригинальную пробирку.

Допускается хранение образцов материала до проведения LAMP-исследования:

– при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – 3 суток (кроме мочи, которую можно хранить не более 6 ч, а в дальнейшем замораживать однократно);

– при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года.

Допускается транспортирование образцов материала при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 3 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Биоптат (операционный материал) гомогенизируют с помощью гомогенизатора или стеклянных бус.

Нативные образцы биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи) подвергнуть предварительной обработке с помощью **NALC-NaOH** с целью их деконтаминации и гомогенизации в соответствии с Приказом Минздрава России от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий

в Российской Федерации (с изменениями на 5 июня 2017 года)» с получением осадков («единых проб»).

Полученные деконтаминированные осадки («единые пробы») пригодны для исследований как микробиологическими, так и молекулярно-генетическими методами.

Отобрать **500 мкл осадка**, полученного после обработки нативного образца биологического материала с помощью **NALC-NaOH**, в микропробирку на 1,5 мл с защелкой. Центрифугировать осадок **15 мин** при **11,5 тыс g** (соответствует **13 тыс об/мин (rpm)** на центрифуге Eppendorf MiniSpin). Удалить **400 мкл** надосадочной жидкости дозатором с одноразовым наконечником с аэрозольным барьером, оставшийся осадок (не более **100 мкл**) ресуспендировать.

При использовании форм 1 или 3 набора реагентов полученный ресуспендированный осадок использовать для экстракции ДНК вручную.

При использовании форм 2 или 4 набора реагентов и автоматической станции необходимо прогреть ресуспендированный осадок в микропробирке с защелкой при **95 °C** в течение **20 мин** (для инактивации МБТ с целью безопасной работы в автоматической станции), далее провести экстракцию ДНК.

Образцы бактериальных культур не подвергать предварительной обработке с помощью **NALC-NaOH**.

В случае с бактериальными культурами, выросшими на плотной питательной среде, ресуспендировать их колонии в стерильном физиологическом растворе (**0,9% NaCl**) или фосфатно-солевом буфере (**PBS**), используя стандарт мутности McFarland № **0,5; 1** или **2**.

В случае с бактериальными культурами, выросшими в жидкой питательной среде, отобрать аликвоту 1 мл и центрифугировать 10 мин при 1 тыс g, затем удалить надосадочную жидкость.

Отобрать 100 мкл культуры микобактерий для этапа экстракции. При выделении ДНК с использованием автоматической станции до этапа экстракции прогреть ресуспендированный осадок в микропробирке с защелкой при 95 °С в течение 20 мин для инактивации МБТ (с целью безопасной работы в автоматической станции), а затем провести экстракцию ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ LAMP-ИССЛЕДОВАНИЯ

LAMP-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Экстракцию ДНК из предварительно обработанного биологического материала человека (мокрота, БАЛ, биоптат, моча) и бактериальных культур проводят одним из способов в соответствии с инструкцией:

- при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 (форма 1 и 3) для выделения НК вручную порядок работы см. в Приложении 1 «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп ТБ вариант 100»;
- при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 (форма 2 и 4) для выделения НК на автоматической станции с магнитными стержнями, например, KingFisher Flex 96 («Thermo Fisher Scientific», США; РУ № ФСЗ 2009/05562), порядок работы см. в Приложении 2 «Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 на автоматической станции с магнитными стержнями».

Экстракцию ДНК из каждого исследуемого образца проводят в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-Mix). В качестве отрицательного контроля экстракции используют 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.

ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

При использовании форм 1 и 2 набора реагентов 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

А1. Подготовка проб для амплификации при использовании «LAMP-комплекта» вариант FRT-100 F (форма 1 и 2)

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, необходимое для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **5 мкл LAMP-смеси-FL МБТ, 10 мкл LAMP-буфера-AMR, 0,5 мкл Bst полимеразы AMR**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 8) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирки с **LAMP-смесью-FL МБТ и LAMP-буфером-AMR**.

ВНИМАНИЕ! Bst полимеразу AMR необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционной смеси

и убирать в морозильную камеру сразу же после добавления в реакционную смесь.

3. Перемешать содержимое всех реагентов LAMP-комплекта:
 - содержимое пробирок с **LAMP-смесью-FL МБТ** интенсивно перемешать на вортексе, **LAMP-буфер-AMR** перемешать переворачиванием пробирки 3-5 раз, избегая вспенивания реагента, осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.
 - фермент **Bst** полимеразу **AMR** аккуратно перемешать пипетированием, осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием.
4. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь: смешать необходимое количество **LAMP-смеси-FL МБТ**, **LAMP-буфера-AMR** и **Bst** полимеразу **AMR**, тщательно перемешать пипетированием и осадить капли кратким центрифугированием.
5. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для изотермической амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
6. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси утилизировать.
7. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл** проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, полученных экстракцией с помощью комплектов реагентов для выделения нуклеиновых кислот методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции и LAMP (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**;
 - б) **положительный контроль экстракции и LAMP (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО ДНК МБТ-LAMP**;
 - в) **отрицательный контроль LAMP (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.

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

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

А2. Подготовка проб для амплификации при использовании «LAMP-комплекта» вариант FRT-96 L (форма 3 и 4)

Общий объем реакционной смеси – 22 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество цефленовых пакетов, каждый из которых содержит по одному стрипу из 8 пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **Смесью-FL МБТ-LAMP Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).

ВНИМАНИЕ! Цефленовые пакеты, содержащие **Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo**, необходимо вскрывать непосредственно перед использованием. Не хранить лиофилизированную смесь после вскрытия цефленового пакета!

2. В каждую пробирку с готовой лиофилизированной реакционной **Смесью-FL МБТ-LAMP Lyo** внести по 10 мкл **Растворителя LAMP-Lyo** и по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, или по 10 мкл контрольных образцов (см. в пункте 3).

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, полученных экстракцией с помощью комплектов реагентов для выделения нуклеиновых кислот методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

3. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции и LAMP (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из **ОКО**;
 - б) **положительный контроль экстракции и LAMP (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из **ПКО ДНК МБТ-LAMP**;
 - в) **отрицательный контроль LAMP (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл **К-**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием до полного растворения лиофилизированной гранулы, не допуская появления пузырьков воздуха.

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 LAMP осуществляется согласно руководству пользователя указанного ПО.

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. 6 и вкладыш, прилагаемый к данному набору реагентов).

Таблица 6 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁵ и планшетного⁶ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	65	30 сек*/ 40 сек**	JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange), Cy5 (Red)	50

* для амплификаторов CFX96 (Bio-Rad) и Rotor-Gene Q (QIAGEN),

** для амплификаторов ДТпрайм (ДНК-Технология) и QuantStudio 5 (Life Technologies);

для амплификаторов ДТпрайм рекомендуется в конце программы амплификации (после блока циклирования) добавить стадию хранения при температуре 20 °C (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 кратким центрифугированием.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

⁵ Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁶ CFX96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК-Технология), QuantStudio 5 (Life Technologies).

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. В случае использования запуска посредством ПО амплификатора анализ и интерпретацию результатов осуществляют вручную. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем различным каналам флуоресцентной детекции в соответствии с табл. 1 настоящей инструкции. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (указан во вкладыше к набору реагентов), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) ⁷ в соответствующей графе таблиц 7 и 8.

Сначала анализируют результаты, полученные для контрольных образцов. Результат LAMP-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 7 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 7 — Результаты для контролей различных этапов исследования

Контроль	Контролируемый этап LAMP-исследования	Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора		
		JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
ОК	Экстракция ДНК, LAMP	Отсутствует	Определенно меньше граничного	Отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, LAMP	Определено меньше граничного	Не учитывается	Определено меньше граничного
К-	LAMP	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

⁷ 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 или 40 секундам, согласно заданной программе амплификации и детекции

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

Затем анализируют результаты, полученные для исследуемых образцов, в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8 — Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу для флуорофора			Результат
JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)	
<u>Определено</u> меньше граничного	Не учитывается	<u>Определено</u> меньше граничного	Обнаружена ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
<u>Определено</u> меньше граничного		Отсутствует	
Отсутствует		<u>Определено</u> меньше граничного	
Отсутствует	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует	НЕ обнаружена ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный*
Отсутствует		<u>Определено</u> больше граничного	
<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**
Отсутствует		<u>Определено</u> больше граничного	
Отсутствует		Отсутствует	

* 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.

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

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции и LAMP (ПК) значения пороговых циклов (C_t) по каналам для флуорофоров JOE (HEX, VIC, Yellow) и/или Cy5 (Red) отсутствуют или превышают граничные значения. Необходимо повторить исследование для всех образцов (начиная с этапа экстракции ДНК).
2. Для отрицательного контроля LAMP (К-) определено значение порогового цикла (C_t) по одному или нескольким каналам для флуорофоров JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange), Cy5 (Red). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации с последующим повтором исследования для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции и LAMP (ОК) определены значения пороговых циклов (C_t) по каналам для флуорофоров JOE (HEX, VIC, Yellow) и/или Cy5 (Red). 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 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 (базовой линии), требуется повторно провести исследование для этого образца.

Критерии отбора проб ДНК, пригодных для анализа с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-І»

Для анализа с помощью другого набора реагентов производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России «АмплиТест® МБТ-Резист-І» (РУ № РЗН 2022/16720) пригодны пробы, для которых: получен результат «Обнаружена ДНК *M. tuberculosis complex*» при использовании набора реагентов «АмплиТест® МБТ-LAMP» и определены значения *Ct* менее граничных по обоим каналам для флуорофоров JOE (HEX, VIC, Yellow) и Cy5 (Red). Если для пробы ДНК определено значение *Ct* только по каналу для флуорофора JOE (HEX, VIC, Yellow) и отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора Cy5, такая проба ДНК МБТ не пригодна для анализа с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-І».

При использовании набора реагентов «АмплиТест® МБТ-LAMP» для отбора проб, пригодных для анализа с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-І», дополнительно добавлять ВКО-М, применяемый в наборе реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-І», в анализируемые образцы при подготовке к амплификации не нужно, поскольку он содержится в ВКО-Mix, используемом в наборе «АмплиТест® МБТ-LAMP».

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Набор реагентов форм 1 и 2 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ-LAMP, ВКО-Mix и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«LAMP-комплект» вариант FRT-100 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

LAMP-смесь-FL МБТ хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 1 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Форма 2. Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ-LAMP, ВКО-Mix и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«LAMP-комплект» вариант FRT-100 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

LAMP-смесь-FL МБТ хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 2 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д.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

Форма 3. Комплект реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ-LAMP, ВКО-Mix и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«LAMP-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo хранить в запаянных цефленовых пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Не хранить лиофилизированную Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo после вскрытия цефленовых пакетов!

Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo из поврежденных цефленовых пакетов не пригодна для проведения анализа.

Форма 4. Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО ДНК МБТ-LAMP, ВКО-Mix и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«LAMP-комплект» вариант FRT-96 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo хранить в запаянных цефленовых пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Не хранить лиофилизированную Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo после вскрытия цефленовых пакетов!

Смесь-FL МБТ-LAMP Lyo из поврежденных цефленовых пакетов не пригодна для проведения анализа.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Код партии



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Дата изменения



Температурный диапа-
зон



Изготовитель



Не использовать при
повреждении упаковки и
обратиться к инструкции
по применению



Осторожно



Содержимого достаточно
для проведения
n-количества тестов



Использовать до



Обратитесь к инструкции
по применению или
к инструкции по
применению
в электронном виде



Не допускать воздей-
ствия солнечного света



Дата изготовления



Знаки опасности

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ТБ» вариант 100

Порядок работы:

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов. Для этого рекомендуется заранее, до начала работы, поместить его на 20 минут на включенный твердотельный термостат, настроенный на температуру 65 °С.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку 10 мкл ВКО-Mix. Добавить в пробирки по 300 мкл Раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с Раствором для лизиса и ВКО внести по 100 мкл подготовленных проб (см. раздел «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК»), используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку(и)⁸ отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести 100 мкл ПКО ДНК МБТ-LAMP.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.
5. Снова центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки.
6. Добавить в пробирки по 400 мкл Раствора для преципитации, тщательно перемешать на вортексе в течение порядка 10 с.
7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin).

⁸ При экстракции НК из образцов с высокой концентрацией МБТ, например, бактериальных культур, рекомендуется каждый такой образец обставлять слева и справа как минимум одним образцом ОК во избежание контаминации соседних образцов.

8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник на 200 мкл без фильтра.
9. Добавить в пробирки по 500 мкл Раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок: для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
10. Процентрифугировать при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin) в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник на 200 мкл без фильтра.
12. Добавить в пробирки по 200 мкл Раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Процентрифугировать при 11,5 тыс g в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость досуха, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник без фильтра на 200 мкл.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по 100 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
17. Процентрифугировать пробирки при 11,5 тыс g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °C до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °C – год и более.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция ДНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 на автоматической станции с магнитными стержнями

Порядок работы на станции, например, KingFisher Flex 96 («Thermo Fisher Scientific», США; РУ № ФСЗ 2009/05562)):

ВНИМАНИЕ! К работе с автоматической станцией может быть допущен только персонал, прошедший обучение работе на станции данного вида. Программирование последовательности действий, указанной ниже, осуществляется с использованием инструкции к конкретному виду станции.

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов. Для этого рекомендуется заранее, до начала работы, поместить его на 20 минут на включенный твердотельный термостат, настроенный на температуру 60 °С.
2. **Смешать в отдельной пробирке ВКО-Mix, буфер GT и магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО-Mix, 10 мкл буфера GT и 20 мкл магнитного сорбента**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов с запасом на один образец.
3. **Внести в лунки глубоколоночного планшета для исследуемых и контрольных образцов по 40 мкл подготовленной смеси**. Промаркировать планшет сбоку.
4. **В каждую лунку планшета добавить по 500 мкл лизирующего буфера Комбо**.
5. **В лунки планшета из п. 4 добавить по 100 мкл исследуемых образцов**.
6. **В лунку(и)⁹ для отрицательного контроля выделения (ОК) планшета из п. 5 внести 100 мкл ОКО. В лунку для положительного контроля выделения (ПК) внести 100 мкл ПК ДНК МБТ-LAMP.**
7. **Внести в лунки трех промаркированных сбоку соответствующих глубоколоночных планшетов, размещаемых на автоматической станции вместе с гребенкой наконечников,**

⁹ При экстракции ДНК из образцов с высокой концентрацией МБТ рекомендуется каждый такой образец обстывать слева и справа, сверху и снизу как минимум одним образцом ОК во избежание контаминации соседних образцов.

- по 700 мкл раствора для отмывки Комбо-1, 500 мкл раствора для отмывки Комбо-2 и по 100 мкл РНК-буфера.
8. Установить планшет с исследуемыми и контрольными образцами, полученными в соответствии с пунктами 5 и 6, на борт автоматической станции.
 9. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми и контрольными образцами при 60°C в течение 5 мин.
 10. Опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на 1 мин.
 11. Перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-1.
 12. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми образцами.
 13. Повторить пункт 10.
 14. Перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-2.
 15. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми образцами.
 16. Повторить пункт 10.
 17. Высушить магнетизированную силику, оставив магнитные стержни с намагниченным сорбентом на открытом воздухе в течение 5 минут.
 18. Поместить магнитные стержни в лунки планшета с элюирующим буфером.
 19. Перемешивать содержимое лунок планшета с исследуемыми образцами при 60°C в течение 5 мин.
 20. Удалить магнитный сорбент из лунок планшета с помощью магнитных стержней.
 21. Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °C до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°C – год и более.

71
Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 40 лист 46
Директор центра постгеномных технологий ФГБУ
«ЦСП» ФМБА России

Г.А. Шипулин



«УТВЕРЖДАЮ»

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



Г.А. Шипулин

2024 г.

Краткие руководства

набора реагентов для выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом изотермической петлевой амплификации

«АмплиТест® МБТ-LAMP»



Краткое руководство

Набор реагентов для выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом изотермической петлевой амплификации «АмплиТест® МБТ-LAMP» форма 1

REF T-B047-1L-FRT

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1
e-mail: promlab@cspfmba.ru

IVD

VER

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Образцы биологического материала человека пригодны для анализа с помощью данного набора реагентов только после их предварительной обработки с помощью NALC-NaOH (с целью их деконтаминации и гомогенизации). Обработка бактериальных культур с помощью NALC-NaOH не требуется.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ с помощью «РИБО-преп ТБ» вариант 100

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-Mix) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов:

1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции и LAMP.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции добавить:

ВКО-Mix	10 мкл	в каждую пробирку (т.е. в пробирки с исследуемыми образцами, а также в пробирки для ОК и ПК)
Исследуемые образцы	100 мкл*	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
ПКО ДНК МБТ-LAMP	100 мкл	в пробирку для ПК

Элюция

РНК-буфер	100 мкл	в каждую пробирку (с высушенным осадком)
-----------	---------	--

*Для образцов биологического материала человека указан объем осадка, полученного после центрифугирования в течение 15 мин при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin) 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца с помощью NALC-NaOH, и удаления надосадочной жидкости.

ВНИМАНИЕ! Реакцию LAMP рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК. Допускается хранение проб ДНК не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – 1 год и более.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой амплификации необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ с помощью «LAMP-комплект» вариант FRT-100 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов положительный контроль экстракции и LAMP (ПК), отрицательный контроль экстракции и LAMP (ОК) и отрицательный контроль LAMP (К-) – по одному повтору каждого.

Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
Разморозить пробирки с **LAMP-смесью-FL МБТ** и **LAMP-буфером-AMR**.

ВНИМАНИЕ! **Bst** полимеразу **AMR** необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционной смеси и убирать в морозильную камеру сразу же после добавления в реакционную смесь.

Перемешать содержимое всех реагентов LAMP-комплекта:

- содержимое пробирок с **LAMP-смесью-FL МБТ** интенсивно перемешать на вортексе, **LAMP-буфер-AMR** перемешать переворачиванием пробирки 3-5 раз, избегая вспенивания реагента, осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.
- фермент **Bst** полимеразу **AMR** аккуратно перемешать пипетированием, осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием.

В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
LAMP-смесь-FL МБТ	$5 \times (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей (K=3); 1 – запас
LAMP-буфер-AMR	$10 \times (N+K+1)$	
Bst полимеразы AMR	$0,5 \times (N+K+1)$	

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

- Отобрать необходимое количество пробирок (индивидуальных или стрипованных) для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки с реакционной смесью для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку с реакционной смесью для ОК
Пробы, экстрагированной из ПКО ДНК МБТ-LAMP	в пробирку с реакционной смесью для ПК
К-	в пробирку с реакционной смесью для К-

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- В случае использования ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы:

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	65	30 с*/40 с**	JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange), Cy5 (Red)	50

* для амплификаторов CFX96 (Bio-Rad) и Rotor-Gene Q (QIAGEN),

** для амплификаторов ДТпрайм (ДНК-Технология) и QuantStudio 5 (Life Technologies);

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

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

В случае использования программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ПО «FRT Manager»; ООО «ИЛС», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) постановка LAMP осуществляется согласно руководству пользователя указанного ПО.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора в любом направлении: вертикально или горизонтально. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

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

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения LAMP с детекцией в режиме «реального времени», или автоматически при использовании ПО «FRT Manager». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

Канал для флуорофора	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
Детектируемая ДНК-мишень	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex	ДНК ВКО	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
Область амплификации	участок гена IS6110	искусственно синтезированная последовательность	участок гена <i>mpb64</i>

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).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов роторного и планшетного типа, необходимые для проведения анализа, и граничные значения C_t , необходимые для интерпретации результатов.

Принципы анализа и интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.



Краткое руководство

Набор реагентов для выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом изотермической петлевой амплификации «АмплиТест® МБТ-LAMP» форма 2

REF T-B047-2L-FRT

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1
e-mail: promlab@cspfmbsa.ru

IVD

VER

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Образцы биологического материала человека пригодны для анализа с помощью данного набора реагентов только после их предварительной обработки с помощью NALC-NaOH (с целью их деконтаминации и гомогенизации). Обработка бактериальных культур с помощью NALC-NaOH не требуется.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ с помощью «Магно-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 на автоматической станции с магнитными стержнями (например, KingFisher Flex 96 («Thermo Fisher Scientific», США; РУ № ФСЗ 2009/05562))

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-Mix) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов:

1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции и LAMP.

В отдельной стерильной пробирке подготовить смесь:

Компонент	Объем, мкл	Обозначения
ВКО-Mix	$10 \times (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей экстракции ($K=2$); 1 – запас
Буфер GT	$10 \times (N+K+1)$	
Магнитный сорбент	$20 \times (N+K+1)$	

Внести в лунки глубоколоночных планшетов

Смесь ВКО-Mix, Буфера GT и Магнитного сорбента	40 мкл	добавить в каждую лунку для исследуемых и контрольных образцов планшета для лизиса
Исследуемые образцы	100 мкл*	в лунки для исследуемых образцов планшета для лизиса
ОКО	100 мкл	в лунку для ОК планшета для лизиса
ПКО ДНК МБТ-LAMP	100 мкл	в лунку для ПК планшета для лизиса

Элюция

РНК-буфер	100 мкл	в каждую лунку для исследуемых и контрольных образцов планшета для элюции
-----------	---------	---

*Для образцов биологического материала человека указан объем осадка, полученного после центрифугирования в течение 15 мин при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin) 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца с помощью NALC-NaOH, и удаления надосадочной жидкости.

ВНИМАНИЕ! Раствор в лунках глубоколоночного планшета после элюции содержит очищенные нуклеиновые кислоты. Пробы ДНК готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ВНИМАНИЕ! Реакцию LAMP рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК. Допускается хранение проб ДНК не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – 1 год и более. Пробы ДНК можно хранить в глубоколоночном планшете, заклеенном пленкой, или перенести в микропробирки с плотно закрывающимися крышками.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ с помощью «LAMP-комплект» вариант FRT-100 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов положительный контроль экстракции ДНК и LAMP (ПК), отрицательный контроль экстракции и LAMP (ОК) и отрицательный контроль LAMP (К-) – по одному повтору каждого.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирки с **LAMP-смесью-FL МБТ** и **LAMP-буфером-AMR**.

ВНИМАНИЕ! **Bst** полимеразу **AMR** необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционной смеси и убирать в морозильную камеру сразу же после добавления в реакционную смесь.

- Перемешать содержимое всех реагентов LAMP-комплекта:
 - содержимое пробирок с **LAMP-смесью-FL МБТ** интенсивно перемешать на вортексе, **LAMP-буфер-AMR** перемешать переворачиванием пробирки 3-5 раз, избегая вспенивания реагента, осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.
 - фермент **Bst** полимеразу **AMR** аккуратно перемешать пипетированием, осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием.
- В отдельной пробирке подготовить одну реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
LAMP-смесь-FL МБТ	$5 \times (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов;
LAMP-буфер-AMR	$10 \times (N+K+1)$	K – количество контролей ($K=3$);
Bst полимеразы AMR	$0,5 \times (N+K+1)$	1 – запас

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

- Отобрать необходимое количество пробирок (индивидуальных или стрипованных) для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

Внести по 15 мкл

Приготовленной реакционной смеси в каждую пробирку

Внести по 10 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки с реакционной смесью для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку с реакционной смесью для ОК
Пробы, экстрагированной из ПК ДНК МБТ-LAMP	в пробирку с реакционной смесью для ПК
К-	в пробирку с реакционной смесью для К-

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- В случае использования ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы:

Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	65	30 с*/40 с**	JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange), Cy5 (Red)	50

для амплификаторов CFX96 (Bio-Rad) и Rotor-Gene Q (QIAGEN),

для амплификаторов ДТпрайм (ДНК-Технология) и QuantStudio 5 (Life Technologies);

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

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

В случае использования программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ПО «FRT Manager»; ООО «ИЛС», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) постановка LAMP осуществляется согласно руководству пользователя указанного ПО.

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора в любом направлении: вертикально или горизонтально. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

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

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения LAMP с детекцией в режиме «реального времени», или автоматически при использовании ПО «FRT Manager». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

Канал для флуорофора	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
Детектируемая ДНК-мишень	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex	ДНК ВКО	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
Область амплификации	участок гена IS6110	искусственно синтезированная последовательность	участок гена <i>mpb64</i>

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 (*Ct*).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов роторного и планшетного, необходимые для проведения анализа, и граничные значения *Ct*, необходимые для интерпретации результатов.

Принципы анализа и интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.



Краткое руководство

Набор реагентов для выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом изотермической петлевой амплификации «АмплиТест® МБТ-LAMP» форма 3

REF T-B047-3LLyo-FRT

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1
e-mail: promlab@cspfmbaru

IVD

VER

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Образцы биологического материала человека пригодны для анализа с помощью данного набора реагентов только после их предварительной обработки с помощью NALC-NaOH (с целью их деконтаминации и омогенизации). Обработка бактериальных культур с помощью NALC-NaOH не требуется.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ с помощью «РИБО-преп ТБ» вариант 100

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-Mix) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов:

отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции и LAMP.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции добавить:

ВКО-Mix	10 мкл	в каждую пробирку (т.е. в пробирки с исследуемыми образцами, а также в пробирки для ОК и ПК)
Исследуемые образцы	100 мкл*	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
ПКО ДНК МБТ-LAMP	100 мкл	в пробирку для ПК

Элюция

РНК-буфер	100 мкл	в каждую пробирку (с высушенным осадком)
-----------	---------	--

Для образцов биологического материала человека указан объем осадка, полученного после центрифугирования в течение 15 мин при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin) 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца с помощью NALC-NaOH, и удаления надосадочной жидкости.

ВНИМАНИЕ! Реакцию LAMP рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК. Допускается хранение проб ДНК не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – 1 год и более.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой амплификации необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ с помощью «LAMP-комплект» вариант FRT-96 L

Исходный объем реакционной смеси: 22 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов положительный контроль экстракции и LAMP (ПК), отрицательный контроль экстракции и LAMP (ОК) и отрицательный контроль LAMP (К-) – по одному повтору каждого.

- Отобрать необходимое количество цефленовых пакетов, каждый из которых содержит по одному стрипу из 8 пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **Смесью-FL МБТ-LAMP Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Цефленовые пакеты, содержащие Смесью-FL МБТ-LAMP Lyo, необходимо вскрывать непосредственно перед использованием. Не хранить лиофилизированную смесь после вскрытия цефленового пакета!

Внести по 10 мкл	
Растворителя LAMP-Lyo	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки с реакционной смесью для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку с реакционной смесью для ОК
Пробы, экстрагированной из ПК ДНК МБТ-LAMP	в пробирку с реакционной смесью для ПК
К-	в пробирку с реакционной смесью для К-

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- В случае использования ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы:

Программа амплификации для приборов планшетного типа				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	65	30 с*/40 с**	JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange), Cy5 (Red)	50

для амплификатора CFX96 (Bio-Rad),

* для амплификаторов ДТпрайм (ДНК-Технология) и QuantStudio 5 (Life Technologies);

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

Настройки приборов см. во вкладыше к набору реагентов.

В случае использования программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ПО «FRT Manager»; ООО «ИЛС», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) постановка LAMP осуществляется согласно руководству пользователя указанного ПО.

Установить стрипованные пробирки в ячейки реакционного модуля прибора в любом направлении (вертикально или горизонтально) при неполной загрузке амплификатора или вертикально при полной загрузке. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки прибора рекомендуется установить стрипы с образцами равноудаленно от краев реакционного модуля амплификатора.

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения LAMP с детекцией в режиме «реального времени», или автоматически при использовании ПО «FRT Manager». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

Канал для флуорофора	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
Детектируемая ДНК-мишень	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex	ДНК ВКО	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
Область амплификации	участок гена IS6110	искусственно синтезированная последовательность	участок гена <i>mpb64</i>

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

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, необходимые для проведения анализа, и граничные значения C_t , необходимые для интерпретации результатов.

Принципы анализа и интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.



Краткое руководство

Набор реагентов для выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом изотермической петлевой амплификации «АмплиТест® МБТ-LAMP» форма 4

REF T-B047-4LLyo-FRT

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, Погодинская ул., д. 10 стр. 1
e-mail: promlab@cspfmba.ru

IVD

VER

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Образцы биологического материала человека пригодны для анализа с помощью данного набора реагентов только после их предварительной обработки с помощью NALC-NaOH (с целью их деконтаминации и омогенизации). Обработка бактериальных культур с помощью NALC-NaOH не требуется.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ с помощью «Магнo-Сорб-Комбо ТБ» вариант 100 на автоматической станции с магнитными стержнями (например, KingFisher Flex 96 («Thermo Fisher Scientific», США; РУ № ФСЗ 2009/05562))

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-Mix) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов:

отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции и LAMP.

В отдельной стерильной пробирке приготовить смесь:

Компонент	Объем, мкл	Обозначения
ВКО-Mix	$10 \times (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей экстракции (K=2); 1 – запас
Буфер GT	$10 \times (N+K+1)$	
Магнитный сорбент	$20 \times (N+K+1)$	

Знест в лунки глубоколуночных планшетов

Смесь ВКО-Mix, Буфера GT	40 мкл	добавить в каждую лунку для исследуемых и контрольных образцов планшета для лизиса
Магнитного сорбента		
Исследуемые образцы	100 мкл*	в лунки для исследуемых образцов планшета для лизиса
ВКО	100 мкл	в лунку для ОК планшета для лизиса
ВКО ДНК МБТ-LAMP	100 мкл	в лунку для ПК планшета для лизиса

Элюция

ВКО-буфер	100 мкл	в каждую лунку для исследуемых и контрольных образцов планшета для элюции
-----------	---------	---

Для образцов биологического материала человека указан объем осадка, полученного после центрифугирования в течение 15 мин при 11,5 тыс g (соответствует 13 тыс об/мин (rpm) на центрифуге Eppendorf MiniSpin) 500 мкл осадка, полученного после обработки нативного образца с помощью NALC-NaOH, и удаления надосадочной жидкости.

ВНИМАНИЕ! Раствор в лунках глубоколуночного планшета после элюции содержит очищенные ДНК и РНК, которые готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ВНИМАНИЕ! Реакцию LAMP рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК. Допускается хранение проб ДНК не выше минус 16 °C до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °C – 1 год и более.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ с помощью «LAMP-комплект» вариант FRT-96 L

Объем реакционной смеси: 22 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов положительный контроль экстракции ДНК и LAMP (ПК),

трицательный контроль экстракции и LAMP (ОК) и отрицательный контроль LAMP (К-) – по одному повторм

Отобрать необходимое количество цефленовых пакетов, каждый из которых содержит по одному стрипу из 8 пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **Смесью-FL МБТ-LAMP Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

НИМАНИЕ! Цефленовые пакеты, содержащие Смес-FL МБТ-LAMP Lyo, необходимо вскрывать непосредственно еред использованием. Не хранить лиофилизированную смесь после вскрытия цефленового пакета!

Внести по 10 мкл	
Растворителя LAMP-Lyo	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки с реакционной смесью для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку с реакционной смесью для ОК
Пробы, экстрагированной из ПКО ДНК МБТ-LAMP	в пробирку с реакционной смесью для ПК
К-	в пробирку с реакционной смесью для К-

НИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления зырьков воздуха.

МПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

В случае использования ПО амплификатора с последующим анализом результатов вручную запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы:

Цикл	Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	65	30 с*/40 с**	JOE (HEX, VIC, Yellow), ROX (Orange), Cy5 (Red)	50

для амплификатора CFX96 (Bio-Rad),
для амплификаторов ДТпрайм (ДНК-Технология) и QuantStudio 5 (Life Technologies);
для амплификаторов ДТпрайм рекомендуется в конце программы амплификации (после блока циклирования) бавить стадию хранения при температуре 20 °С (для охлаждения блока перед извлечением пробирок).

Настройки приборов см. во вкладыше к набору реагентов.

В случае использования программного обеспечения для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных «FRT Manager» (ПО «FRT Manager»; ООО «ИЛС», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) постановка LAMP осуществляется гласно руководству пользователя указанного ПО.

Установить стрипованные пробирки в ячейки реакционного модуля прибора в любом направлении (вертикально или горизонтально) при неполной загрузке амплификатора или вертикально при полной загрузке. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

НИМАНИЕ! В случае неполной загрузки прибора рекомендуется установить стрипы с образцами равноудаленно краев реакционного модуля амплификатора.

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого а проведения LAMP с детекцией в режиме «реального времени», или автоматически при использовании ПО «FRT Manager». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

Канал для флуорофора	JOE (HEX, VIC, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)
Детектируемая ДНК-мишень	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex	ДНК ВКО	ДНК <i>M. tuberculosis</i> complex
Область амплификации	участок гена IS6110	искусственно синтезированная последовательность	участок гена <i>mpb64</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с ановленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для ной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct).

ИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, обходимые для проведения анализа, и граничные значения Ct, необходимые для интерпретации результатов. инципы анализа и интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.

Копия верна

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 11 лист об
Директор центра постгеномных технологий ФГБУ
«ЦСП» ФМБА России



 Г.А. Шипулин