

УТВЕРЖДАЮ



Генеральный директор:
Суворова М.А.

января 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей и
обнаружения генов резистентности к полимиксинам, бета-лактамным,

гликопептидным и фторхинолоновым антибиотикам

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

«ИМП Таргет-Чек»

Версия № 2
10.01.2025

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ	3
2.	НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	6
3.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	7
3.1.	ФОРМА ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	7
3.2.	СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	8
3.3.	ПРИНЦИП МЕТОДА	9
3.4.	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
3.5.	ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ	12
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	13
5.	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	14
6.	ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	15
7.	ВИДЫ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА, ОСОБЕННОСТИ ЗАБОРА МАТЕРИАЛА	17
8.	ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
9.	ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	18
9.1.	ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	18
9.2.	ЭКСТРАКЦИЯ ДНК	19
9.3.	ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ	20
9.4.	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	22
9.5.	АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	23
10.	УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	25
11.	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	26
12.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	26
13.	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	27
14.	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	27
15.	СПИСОК ИСТОЧНИКОВ	27
16.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	29

1. ВВЕДЕНИЕ

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) – группа инфекционных заболеваний мочеиспускательного канала (уретрит), мочевого пузыря (цистит), мочеточников и почек (пиелонефрит), вызываемых грамположительными и грамотрицательными условно-патогенными микроорганизмами (УПМ), а также некоторыми грибками при снижении иммунитета организма-хозяина. ИМП являются одними из самых распространенных инфекций в мире, связанны со снижением качества жизни пациентов и представляют серьёзную медико-социальную проблему. Так, согласно протоколам последнего раунда исследований глобального бремени болезней (Global Burden of Disease Study 2021 (GBD 2021), проводимых Институтом по измерению показателей здоровья и оценке здоровья (ИИМЕ, Сиэтл, США), за период с 1990 по 2019 год во всем мире было зарегистрировано более четырёхсот миллионов случаев заражения ИМП и более двухсот тридцати тысяч смертей от несвоевременной либо неадекватной терапии [1].

Возбудителями ИМП могут быть условно-патогенные микроорганизмы – представители эндогенной микрофлоры человека, а также бактерии экзогенной (привнесённой) микрофлоры. В 50–90% случаев возбудителями ИМП являются уропатогенные штаммы *Escherichia coli* (UPEC). Отличительной чертой штаммов группы UPEC является присутствие генов вирулентности [2]. Одна из классификаций штаммов UPEC основана на выявлении структуры О-антитела (О-полисахарида), высоко вариабельной молекулы на внешней стороне клеточной мембраны. О-антитело обладает высокой иммуногенностью, а его вариабельность интерпретируется как стратегия предотвращения бактериального клиренса иммунной системы. К настоящему времени описано более 188 О-серотипов *E. coli*. Защитные свойства О-антител делают их важными факторами патогенности [3]. Также возбудителями ИМП могут быть другие грамотрицательные и грамположительные бактерии, в том числе: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., а также грибки рода *Candida* [4, 5].

Для выбора эффективной стратегии терапии ИМП оптимальным является обнаружение возбудителя инфекции и определение чувствительности данного микроорганизма к антибактериальным препаратам. Последнее особенно важно в связи с нарастающей тенденцией к приобретению и распространению среди микроорганизмов генов антибиотикорезистентности, осложняющих течение заболевания и препятствующих эффективной терапии [4, 6]. В Таблице 1 представлена информация об основных группах

бактериальных генов, определяющих устойчивость к действию полимиксинов, бета-лактамных, гликопептидных и фторхинолоновых антибиотиков [7-9].

Таблица 1. Наиболее распространённые группы генов антибиотикорезистентности

Классификация ферментов			Группы генов резистентности	Придаваемая резистентность	Группа антибиотиков	
Семейство	Группа	Класс				
Бета-лактамазы	Сериновые бета-лактамазы	A	<i>TEM</i>	Пенамы, пенемы, цефалоспорины, монобактамы	Бета-лактамные антибиотики	
			<i>SHV, GES</i>	Пенамы, карбапенемы, цефалоспорины		
			<i>CTX-M</i>	Цефалоспорины		
			<i>KPC</i>	Пенамы, карбапенемы, цефалоспорины, монобактамы		
			<i>VEB</i>	Цефалоспорины, монобактамы		
			<i>PER</i>	Пенамы, пенемы, карбапенемы, цефалоспорины, монобактамы		
		C	<i>CMY</i>	Цефамицины		
			<i>DHA</i>	Цефамицины, цефалоспорины		
	Металло-бета-лактамазы	B	<i>OXA-23, OXA-48, OXA-58</i>	Пенамы, карбапенемы, цефалоспорины		
			<i>OXA-24/40, OXA-51</i>	Пенамы, карбапенемы, цефалоспорины, монобактамы		
			<i>NDM</i>	Пенамы, карбапенемы, цефамицины, цефалоспорины		
			<i>VIM, IMP</i>	Пенамы, пенемы, карбапенемы, цефамицины, цефалоспорины		
	Пенициллин-связывающие белки		<i>mecA</i>	Пенамы		
Белки устойчивости к хинолонам			<i>qnrB, qnrS</i>	Фторхинолоны	Фторхинолоновые антибиотики	
Кластер генов устойчивости к гликопептидам			<i>vanA, vanB</i>	Ванкомицин, тейкопланин	Гликопептидные антибиотики	
MCR фосфоэтаноламинтрансферазы			<i>MCR-1</i>	Колистин	Полимиксины	

Бета-лактамазы – продуцируемые бактериями ферменты, придающие устойчивость к бета-лактамным антибиотикам посредством разрушения их структуры. Бета-лактамные антибиотики – широкий класс антибиотиков, включающий пениамы (производные пенициллина), пенемы, цефемы (цефалоспорины) и монобактамы. Все они имеют общий элемент в своей молекулярной структуре: бета-лактамное кольцо. Это наиболее широко используемая группа антибиотиков [9].

Белки устойчивости к хинолонам – белки с пентапептидными повторами, которые имитируют ДНК и защищают клетку от активности фторхинолоновых антибиотиков. Фторхинолоны – большая группа синтетических бактерицидных средств широкого спектра действия, имеющих в структуре бицикл на основе вещества 4-хинолон [9].

Кластер генов устойчивости к гликопептидам – гены, экспрессия которых обеспечивает устойчивость к гликопептидным антибиотикам типа ванкомицина и тейкопланина за счёт реструктуризации предшественников пептидогликана с образованием D-Ala-D-Lac [9].

MCR фосфоэтаноламинтрансферазы – группа ферментов, которые катализируют добавление фосфоэтаноламина к липиду А, тем самым препятствуя связыванию колистина (полимиксин) с клеточной мембраной [9]. Полимиксины характеризуются нейротоксичностью и нефротоксичностью, поэтому используются только в крайнем случае, если другие антибиотики противопоказаны или неэффективны – например, в случае лечения инфекции, вызванной мультирезистентными штаммами УПМ [10].

Эпидемиология и характер чувствительности УПМ к антибиотикам различаются в зависимости от региона. Выявление генов резистентности к антибактериальным препаратам основных возбудителей ИМП имеет первостепенное значение для обеспечения оптимального выбора терапии [5].

2. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- 2.1.** Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей и обнаружения генов резистентности к полимиксинам, бета-лактамным, гликопептидным и фторхинолоновым антибиотикам методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «ИМП Таргет-Чек» по ТУ 20.59.52 – 019 – 01058639 – 2025, далее по тексту – набор реагентов.
- 2.2.** Набор реагентов предназначен для выявления в клиническом материале ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей и обнаружения нуклеотидных последовательностей (генов резистентности), определяющих устойчивость бактерий к полимиксинам, бета-лактамным, гликопептидным и фторхинолоновым антибиотикам.
- 2.3.** Материалом для исследования являются препараты ДНК, полученной непосредственно из образцов мочи или из культур микроорганизмов, выращенных путём посева биологического материала (мочи) на жидкую или плотную питательную среду.
- 2.4.** Реагенты для экстракции ДНК не входят в состав набора. Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», РУ № ФСР 2009/05220 от 05 марта 2019 г.). Для выделения ДНК из культур микроорганизмов могут быть также использованы экспресс-методы выделения ДНК (комплект реагентов «Проба-Оптима» (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2022/17496 от 08 июня 2022 г.).
- 2.5.** Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика. Только для исследований *in vitro*.
- 2.6.** Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.
- 2.7.** Показанием к проведению исследования с использованием набора реагентов «ИМП Таргет-Чек» является наличие клинических симптомов острого или хронического инфекционного процесса в мочевыводящих путях, необходимость установления этиологии заболевания и выявления бактериальных генов резистентности к антибиотикам с целью определения тактики лечения или поиска причин неэффективности проводимой ранее антibiактериальной терапии.
- 2.8.** Перечень определяемых микроорганизмов и выявляемых генов резистентности к антибиотикам составлен на основе научных данных о наиболее клинически значимых возбудителях инфекций мочевыводящих путей и наиболее распространённых среди них семействах генов резистентности к антибиотикам.

2.9. Результаты исследования, полученные с применением набора «ИМП Таргет-Чек», могут быть использованы в комплексной диагностике с учётом данных анамнеза и общеклинического обследования пациента, но не должны применяться в качестве единственной основы для постановки диагноза и принятия решения о необходимости терапии.

2.10. Целевая группа пациентов – лица мужского и женского пола всех возрастных групп без ограничений по демографическим и популяционным признакам.

2.11. Потенциальный пользователь – сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку и имеющие достаточную квалификацию для проведения исследований в области диагностики *in vitro* методом ПЦР в режиме реального времени.

2.12. Класс потенциального риска применения – 2б (пункты 9.3.4. и 9.3.5, Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).

2.13. Абсолютных противопоказаний к применению медицинского изделия нет. Относительным противопоказанием является нарушение подготовки к анализу – взятие образцов для исследования ранее, чем через 14 дней после окончания курса антибактериальной терапии.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1. ФОРМА ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор «ИМП Таргет-Чек» имеет одну форму выпуска. Набор рассчитан на проведение 24 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Для анализа одного образца используется 2 стрипа (Стрип № 1 и Стрип № 2), каждый из которых содержит по 8 смесей для амплификации.

Исследование позволяет выявить наличие в образце ДНК следующих возбудителей и последовательностей генов резистентности к антибиотикам:

- ДНК бактерий – *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumonia*, уропатогенных штаммов *Esherichia coli* (UPEC): серогруппы O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O25, O75;
- ДНК возбудителя грибковой инфекции – *Candida albicans*;

- Последовательности генов резистентности к полимиксинам, бета-лактамным, гликопептидным и фторхинолоновым антибиотикам – MCR-1, TEM, SHV, GES, CTX-M-14/15, KPC, VEB, PER, NDM, IMP, VIM, CMY, DHA, OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, mecA, vanA/B, qnrB/S.

Специфичность и схема расположения смесей для амплификации, входящих в состав Стрипа № 1 и Стрипа № 2, каналы флуоресценции для каждого выявляемого возбудителя приведены в Таблице 2 и Таблице 3.

Таблица 2. Расположение и специфичность смесей для амплификации в Стрипе №1 (выявление возбудителей инфекции)

№ лунки	Цвет смеси/воска	Канал детекции и выявляемый возбудитель				ПКО
		FAM	HEX	ROX	Cy5	
1	Голубой/Бесцветный	UPEC O1	BK	UPEC O15	UPEC O4	ПКО-1
2	Бесцветный/Бесцветный	UPEC O75	BK	UPEC O16	UPEC O25	ПКО-1
3	Бесцветный/Бесцветный	UPEC O8	BK	UPEC O2	ОБМ	ПКО-1
4	Бесцветный/Бесцветный	UPEC O7	BK	UPEC O18	UPEC O6	ПКО-1
5	Бесцветный/Бесцветный	Proteus mirabilis	BK	Citrobacter spp	Enterobacter spp	ПКО-1
6	Бесцветный/Бесцветный	Candida albicans	BK	Staphylococcus aureus	Acinetobacter baumannii	ПКО-1
7	Бесцветный/Бесцветный	Pseudomonas aeruginosa	BK	Enterococcus faecalis	Streptococcus agalactiae	ПКО-1
8	Бесцветный/Бесцветный	Klebsiella pneumoniae	BK	Staphylococcus saprophyticus	Streptococcus pyogenes	ПКО-1

Таблица 3. Расположение и специфичность смесей для амплификации в Стрипе №2 (обнаружение генов резистентности к антибиотикам)

№ лунки	Цвет смеси/воска	Канал детекции и выявляемый ген резистентности				ПКО
		FAM	HEX	ROX	Cy5	
1	Голубой/Голубой	SHV	BK	TEM	GES	ПКО-2
2	Бесцветный/Голубой	CTX-M-14/15	BK	-	NDM	ПКО-2
3	Бесцветный/Голубой	KPC	BK	IMP	VIM	ПКО-2
4	Бесцветный/Голубой	CMY	BK	DHA	VEB	ПКО-2
5	Бесцветный/Голубой	mecA	BK	MCR-1	PER	ПКО-2
6	Бесцветный/Голубой	OXA-23	BK	OXA-24/40	OXA-48	ПКО-2
7	Бесцветный/Голубой	OXA-51	BK	OXA-58	ОБМ	ПКО-2
8	Бесцветный/Голубой	qnrB/S	BK	vanA/B	-	ПКО-2

3.2. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В комплект поставки входят:

- набор реагентов (состав реагентов согласно Таблице 4);
- инструкция по применению в печатном и электронном вариантах (доступ к электронному варианту инструкции посредством размещаемого на лицевой этикетке QR кода со ссылкой на облачное хранилище);
- паспорт набора.

Реагенты для экстракции ДНК из биологического материала не входят в состав набора. Выделение ДНК рекомендуется проводить с использованием комплектов реагентов, зарегистрированных в РЗН РФ и предназначенных для применения в клинической лабораторной диагностике. Для выделения ДНК из образцов мочи рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», РУ № ФСР 2009/05220 от 05 марта 2019 г.). Для выделения ДНК из культур микроорганизмов могут быть также использованы экспресс-методы выделения ДНК (комплект реагентов «Проба-Оптима» (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2022/17496 от 08 июня 2022 г.).

Таблица 4. Состав реагентов для проведения ПЦР-амплификации

Компонент набора	Объем компонента, мкл	Количество стрипов/пробирок
Комплект стрипов № 1	20	24 стрипа по 8 пробирок
Комплект стрипов № 2	20	24 стрипа по 8 пробирок
Минеральное масло	2000	5 пробирок
Раствор Таq-полимеразы	1500	3 пробирки
Положительный контрольный образец (ПКО-1)	200	1 пробирка
Положительный контрольный образец (ПКО-2)	200	1 пробирка
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	400	1 пробирка
Крышки для стрипов	-	48 штук

3.3. ПРИНЦИП МЕТОДА

3.3.1. Исследование предполагает качественное обнаружение фрагментов ДНК и выполняется *in vitro* с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Для выявления ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей с обнаружением генов резистентности к полимиксинам, бета-лактамным, гликопептидным и фторхинолоновым антибиотикам используется амплификация специфических участков генома возбудителей. Гибридизация специфических олигонуклеотидов с комплементарными участками генома детектируемых микроорганизмов в присутствии фермента Таq-полимеразы приводит к образованию продуктов амплификации и циклическому экспоненциальному росту их количества. Наличие в реакционной смеси специфических флуоресцентно-меченых зондов Таqман и 5'-3' экзонуклеазная активность Таq-полимеразы позволяют осуществлять детекцию образующихся продуктов амплификации в режиме реального времени. Появление детектируемого сигнала связано с отщеплением флуоресцентной метки и разобщением в пространстве источника флуоресценции и гасителя, при этом интенсивность сигнала прямо пропорциональна

количеству продуктов амплификации и нарастает с каждым последующим циклом. Включение в состав зондов флуоресцентных меток с разными спектральными характеристиками (FAM, ROX, Cy5, HEX) позволяет реализовать принцип мультиплексной ПЦР для детекции нескольких возбудителей в одной пробирке.

3.3.2. Выявление ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей человека в клиническом материале предполагает проведение следующих этапов:

- 1) Первый этап – выделение ДНК из образцов биологического материала (с использованием комплектов реагентов для экстракции ДНК, рекомендованных в п. 2.4. настоящей Инструкции);
- 2) Второй этап – амплификация специфических участков ДНК методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием набора реагентов «ИМП Таргет-Чек».

3.3.3. Набор «ИМП Таргет-Чек» предназначен для использования на амплификаторах детектирующих для постановки ПЦР в режиме реального времени с регистрацией флуоресцентного сигнала по четырём каналам: FAM, HEX, ROX, Cy5. Набор совместим с приборами:

1. Амплификатор детектирующий «ДТлайт», РУ № ФСР 2011/10228 от 03 марта 2011 г., производитель ООО «НПО ДНК-Технология»;
2. Амплификатор детектирующий «ДТпрайм», РУ № ФСР 2011/10229 от 24 марта 2025 г., производитель ООО «НПО ДНК-Технология»;
3. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями (CFX96 Touch), РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016, производитель «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США.

3.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.4.1. Аналитическая чувствительность набора в отношении отдельных микроорганизмов представлена в **Таблице 5**. Для контроля прохождения ПЦР и оценки качества выделенной ДНК используется эндогенный внутренний контроль (ВК). Амплификационные смеси содержат в своём составе олигонуклеотиды, специфичные к участку гена GAPDH человека. При анализе проб ДНК, выделенных из культур микроорганизмов в качестве ВК используется показатель ОБМ (общая бактериальная масса).

Таблица 5. Значения аналитической чувствительности и каналы детекции флуоресцентного сигнала для каждого определяемого показателя

№ лунки	Смесь для амплификации	Канал детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл
1	UPEC O1/BK/O15/O4	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
2	UPEC O75/BK/O16/O25	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
3	UPEC O8/BK/O2/ОБМ	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
4	UPEC O7/BK/O18/O6	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
5	Proteus mirabilis/BK/Citrobacter spp/Enterobacter spp	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
6	Candida albicans/BK/Staphylococcus aureus/Acinetobacter baumannii	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
7	Pseudomonas aeruginosa/BK/Enterococcus faecalis/Streptococcus agalactiae	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
8	Klebsiella pneumonia/BK/Staphylococcus saprophyticus/Streptococcus pyogenes	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
9	SHV/BK/TEM/GES	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
10	CTX-M-14,CTX-M-15/BK/NDM	FAM/HEX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
11	KPC/BK/IMP/VIM	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
12	CMY/BK/DHA/VEB	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
13	mecA/BK/MCR/PER	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
14	OXA-23/BK/OXA-24,OXA-40/OXA-48	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
15	OXA-51/BK/OXA-58/ОБМ	FAM/HEX/ROX/Cy5	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴
16	qnrB,qnrS/BK/vanA,vanB	FAM/HEX/ROX	10 ⁴ /10 ⁴ /10 ⁴

3.4.2. Аналитическая специфичность набора реагентов «ИМП Таргет-Чек» в отношении всех выявляемых возбудителей и показателей, а также отсутствие перекрёстных реакций подтверждены секвенированием по методу Сэнгера. Показано отсутствие неспецифических реакций при тестировании образцов биоматериала, содержащих ДНК человека в концентрации до 1,0x10⁹ ГЭ/мл образца.

3.4.3. Диагностические характеристики были установлены при проведении клинико-лабораторных испытаний. Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) составили:

Образцы	Показатель	Стрип	ДЧ		ДС	
			Число образцов	Значение (90% ДИ)	Число образцов	Значение (90% ДИ)
Моча	ДНК возбудителей	1	72	100% (95,93% – 100%)	25	100% (88,71% – 100%)
	Гены резистентности	2	25	100% (88,71% – 100%)	25	100% (88,71% – 100%)
Культуры микро-организмов	ДНК возбудителей	1	85	100% (96,54% – 100%)	–	–
	Гены резистентности	2	85	100% (96,54% – 100%)	25	100% (88,71% – 100%)
Всего образцов биоматериала		72			50	
Всего образцов культур		85			25	

3.4.4. Повторяемость и воспроизводимость результатов, получаемых с использованием набора реагентов «ИМП Таргет-Чек», оценивалась при анализе клинических образцов, предусмотренных назначением набора. Расчёт коэффициентов вариации (K_B) для пороговых циклов C_t показал незначительную степень рассеивания; при оценке повторяемости и воспроизводимости значение K_B не превышало 7,9%.

3.5. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

3.5.1. Наличие в исходном биологическом материале или в образце ДНК веществ, способных ингибиовать прохождение реакции амплификации, может быть причиной получения ложноотрицательных результатов исследования. Потенциальными ингибиторами эндогенного происхождения являются компоненты крови (гемоглобин, билирубин) и кожного жира (триглицериды, холестерин). Экзогенными ингибиторами могут быть присутствующие в реагентах для экстракции нуклеиновых кислот химические вещества (метил-ацетат, изопропиловый спирт) – при неполном их удалении в процессе экстракции ДНК. Компоненты питательных сред, используемых для культивирования микроорганизмов, также относятся к потенциально ингибирующим веществам экзогенного происхождения и могут оказывать влияние на результаты анализа образцов ДНК, полученных из бактериальных культур.

3.5.2. При соблюдении правил проведения процедуры экстракции ДНК вещества, обладающие способностью ингибиовать прохождение реакции амплификации, удаляются из образцов биоматериала и не оказывают влияния на результат анализа. Для предотвращения рисков неполного удаления ингибиторов для выделения ДНК из образцов мочи не рекомендуется использовать экспресс-методы экстракции нуклеиновых кислот.

3.5.3. Концентрации потенциально интерферирующих веществ, при добавлении которых не наблюдалось ингибирования реакции амплификации:

Исследуемый биоматериал	Интерферент	Тип интерферента	Исследованная концентрация вещества в образце биоматериала
Моча	Билирубин	Эндогенный	680 мкмоль/л
	Гемоглобин		350 мкг/мл
	Холестерин		13 ммоль/л
Бактериальная культура из мочи	Кровяной агар	Экзогенный (питательные среды)	15 мг/мл
	Среда LB-агар		15 мг/мл
	Жидкая среда LB		25 мкл/мл
Препарат ДНК, полученный из	Интерферент	Тип интерферента	Исследованная концентрация вещества в

биоматериала			препарate ДНК
Моча, бактериальная культура из мочи	Изопропиловый спирт	Экзогенный (компоненты наборов для выделения ДНК)	100 мкл/мл
	Метилацетат		100 мкл/мл

Примечание: Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивали путём добавления потенциальных интерферентов в образцы биологического материала объёмом 100 мкл на этапе экстракции ДНК (эндогенного происхождения – холестерин, гемоглобин, билирубин, экзогенного происхождения – кровяной агар, среда LB-агар, среда LB), а также непосредственно в препараты ДНК (изопропиловый спирт и метилацетат – вещества, присутствующие в препарате ДНК в случае неполного удаления промывочных растворов в ходе процедуры экстракции) в указанных концентрациях. Подготовленные таким образом образцы использовали для постановки ПЦР с использованием набора реагентов «ИМП Таргет-Чек».

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1.** Класс потенциального риска применения набора реагентов в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий – 26 (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).
- 4.2.** При разработке и производстве набора реагентов соблюдены требования ГОСТ ISO 14971-2021 по минимизации рисков, связанных с применением медицинского изделия.
- 4.3.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, набор не содержит в своём составе материалов человеческого или животного происхождения.
- 4.4.** Исследуемые с использованием набора образцы ДНК должны рассматриваться как потенциально инфекционно-опасные.
- 4.5.** Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей требования МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».
- 4.6.** Лабораторный процесс должен быть однона правленным. Для разных этапов проведения анализа используются раздельные помещения (зоны). Работу следует

начинать в зоне выделения, продолжать в зоне амплификации и детекции. Не разрешается возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

4.7. К работе с набором допускается специально обученный персонал, прошедший подготовку на специализированных курсах по работе с микроорганизмами II-IV групп патогенности и имеющий дополнительное специальное образование по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.8. Разрешается применение набора только строго по назначению, согласно данной инструкции и в пределах обозначенного срока годности.

4.9. Не допускается использование набора при повреждении внутренней упаковки или несоответствии внешнего вида реагентов описанию.

4.10. Не допускается использование набора, если не были соблюдены условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

4.11. Не допускается смешивание реагентов разных серий.

4.12. В процессе работы обязательно использование индивидуальных средств защиты: одноразовых перчаток, лабораторных халатов. При работе с набором следует избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При попадании компонентов набора на кожу рекомендуется немедленно промыть место контакта проточной водой.

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ И СРЕДСТВ ИЗМЕРЕНИЯ

Наименование	Тип, разряд
ПЦР-бокс	«БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия
Микроцентрифуга-вортекс 0-3000 об/мин	FV-2400, фирма «Биосан», Латвия, Рига
Холодильник бытовой от 2 °C до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C	Vestel, VDD 260 VS, Россия
Одноканальные полуавтоматические дозаторы переменного объема	«Биохит», Россия

Амплификатор детектирующий для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	<p>Перечень амплификаторов, валидированных для работы с набором:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Амплификатор детектирующий «ДТлайт», РУ № ФСР 2011/10228 от 03 марта 2011 г., производитель ООО «НПО ДНК-Технология»; 2. Амплификатор детектирующий «ДТпрайм», РУ № ФСР 2011/10229 от 24 марта 2025 г., производитель ООО «НПО ДНК-Технология»; 3. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями (CFX96 Touch), РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016, производитель «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США.
Наборы реагентов для выделения ДНК из биологического материала	<ol style="list-style-type: none"> 1. «ДНК-сорб-В», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РУ № ФСР 2009/05220 от 05 марта 2019 г. (валидирован для работы с набором «ИМП Таргет-Чек» при выделении ДНК из образцов мочи и культур микроорганизмов). 2. «Проба-Оптима», ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2022/17496 от 08 июня 2022 г. (валидирован для работы с набором «ИМП Таргет-Чек» при выделении ДНК из культур микроорганизмов).

Дополнительные материалы:

- штатив «рабочее место» для стрипованных и обычных пробирок объемом 0,2 мл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5–10 мкл и 20–200 мкл;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки смотровые одноразовые неопудренные;
- емкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующий раствор.

ПРИМЕЧАНИЕ. Допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

6. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

6.1. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала должно проводиться в строгом соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Москва, 2021) [11].

6.2. Материалом для исследования являются моча и культуры микроорганизмов из этого биоматериала.

6.3. Сбор клинического материала и его упаковку должен осуществлять работник медицинской организации, прошедший обучение требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II-IV групп патогенности.

6.4. Взятие образцов мочи для проведения ПЦР-исследования должно осуществляться в стерильный пластиковый контейнер для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов (например, контейнер объёмом 60 мл производства АО «Перинт», Россия (РУ № ФСР 2010/07338 от 24 января 2023 г.) или аналогичный). Сбор мочи может быть произведён в стерильный контейнер для сбора биоматериалов со встроенным устройством для вакуумного отбора мочи, мочеприёмник педиатрический стерильный или вакуумную пробирку для сбора мочи со стабилизатором.

6.5. Сроки и условия транспортирования и хранения биоматериала различаются для нативных образцов мочи и образцов, собранных в вакуумные пробирки для мочи со стабилизатором. Нативные образцы мочи транспортируют и хранят при температуре от 18 до 25°C – в течение 1–2 часов; при температуре от 2 до 8°C – в течение 24 часов; при температуре минус 20°C – в течение 7 суток; при температуре не выше минус 68°C – длительно. При использовании вакуумных пробирок для мочи со стабилизатором образцы транспортируют и хранят при температуре от 18 °C до 25 °C – в течение 8 часов; при температуре от 2 °C до 8 °C – в течение 48 часов; при температуре минус 20 °C – в течение 3 месяцев; при температуре не выше минус 68 °C – длительно. Допускается однократное замораживание–оттаивание биоматериала.

6.6. Сроки и условия транспортирования и хранения нативных образцов мочи должны быть скорректированы, если перед проведением исследования методом ПЦР предполагается анализ образцов мочи с использованием бактериологических методов (посев на жидкие или плотные питательные среды). Такие образцы должны быть доставлены в лабораторию не позднее, чем через 48 часов после взятия. До исследования образцы хранят при комнатной температуре.

6.7. Культуры микроорганизмов, выращенные на твёрдой среде и ресуспендированные в 0,9 % растворе натрия хлорида или выросшие на жидкой питательной среде допускается хранить и транспортировать при температуре от 18 °C до 25 °C – в течение 24 ч, при температуре от 2 °C до 8 °C – в течение 7 суток, при температуре от минус 24 °C до минус 16 °C – в течение 12 месяцев, при температуре не выше минус 68 °C – длительно. Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

6.8. Транспортирование клинического материала необходимо осуществлять в соответствии с ГОСТ Р 59787-2021/ISO/TS 20658:2017 «Лаборатории медицинские. Требования к взятию, транспортированию, получению и обработке биологического материала». Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II-IV групп патогенности. Транспортная ёмкость с завинчивающейся крышкой, промаркированная и проверенная на герметичность, может быть дополнительно герметизирована пластификаторами (парафин, парафильм и др.). Герметично закрытая транспортная ёмкость помещается в контейнер для транспортировки биологических материалов с охлаждающими термоэлементами.

7. ВИДЫ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА, ОСОБЕННОСТИ ЗАБОРА МАТЕРИАЛА

7.1. Моча

Сбор мочи проводят после тщательного туалета наружных половых органов. Для исследования отбирают первую порцию утренней мочи в объёме 15,0–30,0 мл в контейнер, плотно закрывают крышкой. У новорождённых и детей грудного возраста допускается сбор мочи с помощью мочеприёмника педиатрического. При использовании для хранения и транспортировки вакуумной пробирки для мочи со стабилизатором образец мочи перемешивают переворачиванием в исходной ёмкости, вставляют крышку вакуумной пробирки в устройство для отбора (иглу держателя), надавливают, чтобы игла устройства/держателя проколола крышку пробирки, наполняют пробирку и затем вынимают её из устройства/держателя. Пробирку переворачивают 6–8 раз для тщательного перемешивания мочи со стабилизатором.

7.2. Культура микроорганизмов

Предназначенные для исследования колонии микроорганизмов снимают с поверхности плотной питательной среды микробиологической петлей и ресуспенсируют в 0,9% растворе натрия хлорида. После определения концентрации микроорганизмов отбирают 1,0 мл материала и переносят в пробирку, используя пастеровскую пипетку. При исследовании культуры, выросшей на жидкой питательной среде, из оригинального флакона отбирают 1,0 мл материала и переносят в пробирку, используя пастеровскую пипетку.

8. ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

- 8.1.** Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе 2 «Назначение и область применения», взятие, транспортирование и хранение которого проводилось в соответствии с разделом 6 настоящей Инструкции. Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.
- 8.2.** Перед проведением исследования пробы биоматериала должны пройти этап предварительной обработки в соответствии с п. 9.1. «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК» настоящей Инструкции.
- 8.3.** Контролем адекватного взятия материала и качественно проведённой процедуры экстракции ДНК из **мочи** является регистрация флуоресцентного сигнала и определение порогового цикла Ct по каналу НЕХ в каждой пробирке Стрипа №1 и Стрипа №2. Наличие флуоресцентного сигнала по каналу НЕХ указывает на амплификацию фрагмента ДНК, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля.
- 8.4.** Контролем адекватного взятия материала и качественно проведённой процедуры экстракции ДНК из **культуры микроорганизмов** является регистрация флуоресцентного сигнала и определение порогового цикла Ct по каналу Су5 для показателя ОБМ (Стрип №1, лунка 3 и Стрип №2, лунка 7 – в соответствии с **Таблицей 2 и Таблицей 3**), что в данном случае соответствует прохождению ВК в соответствии с Инструкцией.

9. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Предварительная обработка исследуемого биоматериала (моча и культура микроорганизмов из этого биоматериала) проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Москва, 2021) [11].

9.1.1. Предварительная обработка мочи. Образец мочи перемешивают в исходной ёмкости. 1,0 мл материала переносят в пробирку объёмом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют 5 мин при 10000 g (12000 об/мин для лабораторной миницентрифуги «MiniSpin», РУ № ФСЗ 2012/13316 от 05 декабря 2012 г.). Удаляют супернатант, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставляя 100 мкл надсадочной жидкости и осадок. Полученный образец используют для

экстракции ДНК. При необходимости объём образца мочи может быть увеличен до 5–10 мл.

9.1.2. Способ предварительной обработки культуры микроорганизмов, выросшей на плотной питательной среде. Содержимое пробирки тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать 60 с при 12000 g (13400 об/мин). Перенести 5 мкл материала, используя наконечник с фильтром, в пробирку объёмом 1,5 мл с 95 мкл 0,9% раствора натрия хлорида. Полученную пробу после тщательного перемешивания на вортексе и осаждения капель со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с использовать для экстракции ДНК.

9.1.3. Способ предварительной обработки культуры микроорганизмов, выросшей на жидкой питательной среде. Пробирку с исследуемым материалом центрифугировать 10 мин при 12000 g (13400 об/мин). Удалить супернатант, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 100–200 мкл надосадочной жидкости и осадок. Полученную пробу после тщательного перемешивания на вортексе и осаждения капель со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с использовать для экстракции ДНК.

9.2. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ВНИМАНИЕ! Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала не входит в состав набора.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплекты реагентов, зарегистрированные в РЗН РФ и предназначенные для применения в клинической лабораторной диагностике:

- «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», РУ № ФСР 2009/05220 от 05 марта 2019 г.) – для выделения ДНК из клинических образцов мочи и культур микроорганизмов, полученных путём посева биологического материала (мочи) на жидкую или плотную питательную среду;
- «Проба-Оптима» (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2022/17496 от 08 июня 2022 г.) – для выделения ДНК из образцов культур микроорганизмов.

ВНИМАНИЕ! Экстракция ДНК из клинического материала осуществляется в соответствии с инструкцией производителя к соответствующему набору реагентов.

9.3. ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ

Общий объём реакционной смеси – 35 мкл, включая объём пробы ДНК – 5 мкл.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации при внесении в пробирки реагентов, образцов ДНК и контрольных образцов рекомендуется использовать только одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами и закрывать крышки сразу после внесения образца.

Порядок выполнения исследования:

9.3.1. В штатив поставить необходимое количество стрипов со смесями для амплификации. Для каждого исследуемого образца, ПКО и ОКО необходимо подготовить два стрипа: один Стрип №1 и один Стрип №2. Порядок расположения пробирок в стрипах строго регламентирован (Таблица 2 и Таблица 3). Для правильной ориентации стрипов при постановке их в прибор смесь для амплификации в первой пробирке каждого стрипа окрашена;

9.3.2. Осадить капли с крышечек пробирок с раствором Таq-полимеразы, минерального масла, ПКО-1, ПКО-2, ОКО кратковременным центрифугированием на мини-центрифуге (вортексе);

9.3.3. В каждую пробирку, не повреждая слой воска, внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы;

9.3.4. В каждую пробирку внести по капле минерального масла;

9.3.5. Закрыть крышки стрипов;

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации рекомендуется перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься образец, и закрывать её перед внесением следующего образца.

9.3.6. Внести в каждую пробирку Стрипа №1 и Стрипа №2, предназначенных для отрицательного контрольного образца, по 5 мкл ОКО;

9.3.7. Внести во все пробирки Стрипа №1 и Стрипа №2, предназначенных для исследуемых образцов, по 5 мкл соответствующей анализируемой пробы ДНК;

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

9.3.8. Внести в каждую пробирку Стрипа №1, предназначенного для положительного контрольного образца, по 5 мкл ПКО-1;

9.3.9. Внести в каждую пробирку Стрипа №2, предназначенного для положительного контрольного образца, по 5 мкл ПКО-2;

9.3.10. Установить все стрипы в блок детектирующего амплификатора в соответствии с вместимостью детектирующего блока используемого прибора. Стрипы нужно расположить следующим образом: Стрип №1, Стрип №2, Стрип №1 последующего образца и т.д.;

9.3.11. Запрограммировать амплификатор в соответствии с параметрами, указанными в Таблице 3, и выбрать 4 канала детекции флуоресцентного сигнала – FAM, HEX, ROX, Cy5.

9.3.12. В настройках окна «Протокол» внести количество образцов, ОКО и ПКО, внести в протокол постановки идентификаторы образцов. После заполнения протокола постановки запустить выполнение программы амплификации.

9.3.13. При проведении исследования с использованием амплификаторов ДТлайт и ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-технология») рекомендуется использовать ini-файлы, содержащие протоколы исследований и параметры амплификации. Для этого необходимо скачать файл «IMP Target-Check-U.ini» – для анализа проб ДНК, выделенных из образцов мочи, и/или «IMP Target-Check-C.ini» – для анализа проб ДНК, выделенных из образцов культур микроорганизмов (ссылка на файлы размещена в разделе Продукция на сайте: alphalabs.ru) и загрузить его, соблюдая следующую последовательность действий:

- Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором»;
- В меню «Тест» окна программы «RealTime_PCR» выберите команду «Копировать группы тестов» и пункт «из *.ini-файла»;
- В открывшемся окне проводника выберите нужный ini-файл, нажмите «Открыть» – файл переместится в левое окно копирования тестов;
- В строке над правой частью окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, который будет использовать данный тест;
- В списке слева отметьте галочкой необходимый для импорта тест и нажмите на появившуюся в центре синюю стрелку. Файл с параметрами теста переместится в правое окно и будет выведено сообщение «Копирование тестов успешно завершено».

Файлы «IMP Target-Check-U.ini» и «IMP Target-Check-C.ini» загружаются однократно, повторная загрузка перед каждой постановкой не требуется. При последующих запусках прибора протокол амплификации будет доступен в меню «Добавить тест», при выборе

теста «IMP Target-Check-U» или «IMP Target-Check-C» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в Таблице 6.

9.3.14. Для корректной интерпретации данных при проведении исследования расположение пробирок со смесями для каждого исследуемого образца должно соответствовать схеме, приведённой в окне программы «RealTime_PCR». При необходимости (например, при использовании для постановки амплификатора ДТлайт), схема расположения пробирок может быть откорректирована с помощью функции «Порядок заполнения» в окне «Протокол» программы «RealTime_PCR».

Таблица 6. Параметры программы амплификации

Для амплификаторов ДТлайт и ДТпрайм:

Программа амплификации		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	15 мин	1
94°C	10 с	
59°C	10 с *	
72°C	10 с	
10 °C – хранение		

* – детекция флуоресцентного сигнала

Для амплификатора CFX-96 Touch:

Программа амплификации		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	15 мин	1
94°C	10 с	
59°C	15 с	
72°C	10 с	
94°C	10 с	
59°C	15 с *	
72°C	10 с	
10 °C – хранение		

* – детекция флуоресцентного сигнала

9.4. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

9.4.1. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием детектирующего амплификатора. После окончания реакции детектирующий амплификатор автоматически формирует отчёт об исследовании,

включающий данные о величине индикаторного цикла для каждой ячейки амплификатора, в которой прибором зарегистрировано нарастание флуоресценции.

9.4.2. Результаты исследования оценивают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривых флуоресценции по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данного образца значения порогового цикла Ct.

9.5. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.5.1. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции по соответствующему каналу детекции (FAM, HEX, ROX и Cy5) с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct.

9.5.2. Обработку данных следует начинать с результатов амплификации положительного (ПКО) и отрицательного (ОКО) контрольных образцов для каждой реакционной смеси. Результат постановочной серии считается достоверным, если для ПКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 при прохождении амплификации, а для ОКО флуоресцентный сигнал по всем указанным каналам отсутствует или значение порогового цикла Ct ≥ 33 .

9.5.3. Заключение о наличии или отсутствии в исследуемом образце ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей и генов резистентности к полимиксинам, бета-лактамным, гликопептидным и фторхинолоновым антибиотикам делается на основании наличия или отсутствия детектируемого флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу флуоресценции (в соответствии с Таблицами 2 и 3).

9.5.4. При исследовании образцов ДНК из **мочи** регистрация флуоресцентного сигнала и определение порогового цикла Ct по каналу HEX во всех пробирках Стрипа №1 и Стрипа №2 свидетельствует об адекватном прохождении эндогенного внутреннего контроля. В качестве эндогенного внутреннего контроля используется амплификация фрагментов генома человека.

9.5.5. При исследовании образцов ДНК из **культур микроорганизмов** эндогенным внутренним контролем является амплификация фрагментов бактериальной ДНК (16S ДНК) с регистрацией флуоресцентного сигнала и определением порогового цикла Ct по каналу Cy5 (показатель ОБЧ, Стрип №1, лунка 3 и Стрип №2, лунка 7 – в соответствии с Таблицей 2 и Таблицей 3).

9.5.6. При отсутствии флуоресцентного сигнала по всем каналам флуоресценции, включая канал НЕХ (образцы ДНК из мочи) и канал Су5 (образцы ДНК из культуры микроорганизмов), исследование образца должно быть выполнено повторно для исключения ложноотрицательного результата.

9.5.7. При проведении исследования на амплификаторах ДТлайт и ДТпрайм с использованием шаблонных тестов (ini-файл) «IMP Target-Check-U.ini» или «IMP Target-Check-C.ini» отчёт об исследовании формируется автоматически в окне «Анализ оптических измерений» и может быть сохранён через функцию «Бланк ответа» или экспортирован в лабораторную информационную систему в формате XML.

9.5.8. В окне «Бланк ответа» реализована возможность ручного добавления заключения по результатам проведённого анализа для каждой пробы. Для этого необходимо выполнить следующие действия:

- Нажать пункт «Бланк ответа» в окне «Анализ оптических измерений»;
- В открывшемся окне «Бланк ответа» последовательно отметить галочкой пункты «Заключение», «Ручное»;
- Нажать на символ восклицательного знака в верхней строке окна «Бланк ответа»;
- В открывшемся окне «Информационные поля» имеется возможность заполнить раздел «Заключение» для каждой проанализированной пробы. Конструктор заключений приведён в Таблице 7. Перемещение между отчётомами по каждой пробе осуществляется посредством нажатия на синие стрелочки в этом же окне;
- После завершения редактирования нажать «Применить». Отчёт с заключением может быть сохранён и распечатан, как обычно.

Таблица 7. Конструктор заключений

Стрип №1 – выявление возбудителей инфекции	
В заключении перечисляются выявленные возбудители	
Результат анализа	Варианты выдаваемого заключения на основе выявленных показателей
	Выявлена ДНК бактерии(-й)... Показатель Proteus mirabilis, Citrobacter spp., Enterobacter spp., Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pyogenes, Klebsiella pneumonia, уропатогенные штаммы <i>Escherichia coli</i> (UPEC): серогруппы O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O25, O75
Наличие значения порогового цикла Ct по показателям Стрипа №1	Выявлена ДНК возбудителя грибковой инфекции... Показатель <i>Candida albicans</i>
Отсутствие значения	ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей не

порогового цикла Ct по показателям Стрипа №1 (включая показатель ОБЧ)	обнаружена					
Наличие значения порогового цикла Ct ТОЛЬКО по показателю ОБЧ (в Стрипе №1, лунка 3 и/или в Стрипе №2, лунка 7)	Видовая принадлежность возбудителя инфекции мочевыводящих путей не определена. Рекомендуется проведение дополнительного исследования					
Стрип №2 – обнаружение генов резистентности к антибиотикам						
В заключении перечисляются выявленные маркеры резистентности и группы антибиотиков, к которым обнаружена устойчивость						
Результат анализа	Варианты выдаваемого заключения на основе выявленных показателей					
Наличие значения порогового цикла Ct по показателям Стрипа №2	Обнаружены гены резистентности...					
	Показатель	Группа антибиотиков				
	TEM, SHV, GES, CTX-M-14/15, KPC, VEB, PER, NDM, IMP, VIM, CMY, DHA, OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58	...к бета-лактамным антибиотикам				
	qnrB/S	...к фторхинолоновым антибиотикам				
	vanA/B	...к гликопептидным антибиотикам				
MCR-1	...к полимиксинам					
Отсутствие значения порогового цикла Ct по показателям Стрипа №2	Гены резистентности к полимиксинам, бета-лактамным, гликопептидным и фторхинолоновым антибиотикам не обнаружены					

9.5.9. При работе с использованием амплификатора детектирующего «CFX96 Touch» анализ данных и их интерпретация возможны после установки базовой линии для выбранного канала флуоресценции. Базовая линия должна быть установлена таким образом, чтобы её пересечение с флуоресцентной кривой соответствовало началу экспоненциального роста уровня флуоресценции. Значения пороговых циклов Ct для анализируемых проб могут быть скопированы в буфер обмена Windows и сохранены в виде текстового файла или файла Excel.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Срок годности набора реагентов «ИМП Таргет-Чек» – 12 месяцев с даты изготовления.

10.2. Транспортирование набора реагентов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от +2°C до 8°C в течение всего срока годности набора.

10.3. Набор должен храниться при температуре от +2°C до 8°C в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Хранение в указанных условиях осуществляют в течение всего срока годности.

10.4. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.5. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов (12 месяцев с даты изготовления).

10.6. Условия хранения отдельных компонентов набора реагентов «ИМП Таргет-Чек» указаны на упаковке. Комплекты стрипов необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре от +2°C до 8°C. Раствор Таq-полимеразы необходимо хранить при температуре от +2°C до 8°C.

10.7. Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима применению не подлежит.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1. Наборы, потерявшие свои потребительские качества в результате ненадлежащего хранения, а также наборы и их компоненты с истёкшим сроком годности подлежат утилизации в соответствии с 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, организаций и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», Раздел X – Требования к обращению с отходами. Сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

11.2. Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

12.1. Гарантийный срок годности Набора реагентов устанавливается со дня приёмки изделия отделом технического контроля предприятия-изготовителя.

12.2. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

13. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

13.1. Производитель: ООО «Альфалаб», Россия. Адрес производителя: 197022, Санкт Петербург, ул. Академика Павлова, д. 14А, литер А, помещ. 23-Н.

13.2. По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Альфалаб» по адресу: 197022, Санкт Петербург, ул. Академика Павлова, д. 14А, литер А, помещ. 23-Н или по электронной почте: info@alphalabs.ru (Служба клиентской поддержки), support@alphalabs.ru (Служба технической поддержки).

14. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор «ИМП Таргет-Чек» предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

15. СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Yang X., Chen H., Zheng Y., Qu S., Wang H., Yi F. Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report // *Frontiers in Public Health*. – 2022. – Т. 10. DOI: 10.3389/fpubh.2022.888205.
2. Whelan S., Lucey B., Finn K. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment // *Microorganisms*. – 2023. – Т. 11. – № 9. DOI: 10.3390/microorganisms11092169.
3. Letarov A. V. Bacterial Virus Forcing of Bacterial O-Antigen Shields: Lessons from Coliphages // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Т. 24. – № 24. DOI: 10.3390/ijms242417390.
4. Flores-Mireles A., Walker J., Caparon M., Hultgren S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options // *Nature reviews microbiology*. – 2015. – Т. 13. – № 5. – С. 269-284. DOI: 10.1038/nrmicro3432.
5. Gajdács M., Urbán E. Resistance Trends and Epidemiology of *Citrobacter-Enterobacter-Serratia* in Urinary Tract Infections of Inpatients and Outpatients (RECESUTI): A 10-Year Survey // *Medicina*. – 2019. – Т. 55. – № 6. DOI: 10.3390/medicina55060285.
6. Sarra S., Arsene M. M. J., Grigorievna V. E., Victorovna P. I., Vyacheslavovna Y. N., Nikolaïevna B. M. Antibiotic resistance pattern of uropathogenic *Escherichia coli*

isolated from children with symptomatic urinary tract infection in Moscow, Russia // International Journal of One Health. – 2021. – Т. 7. – №. 2. – С. 212-219. DOI: 10.14202/IJOH.2021.212-219.

7. Кузьменков А. Ю., Виноградова А. Г., Трушин И. В., Эйдельштейн М. В., Авраменко А. А., Дехнич А. В., Козлов Р. С. AMRmap – система мониторинга антибиотикорезистентности в России // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т.23. – №2. – С. 198-204. DOI: 10.36488/cmac.2021.2.198-204.
8. Виноградова А. Г., Кузьменков А. Ю. Практическое применение AMRmap: элементы подхода «от общего к частному» на примере *Klebsiella pneumoniae* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т.21. – № 2. – С. 181-186. DOI: 10.36488/cmac.2019.2.181-186.
9. Alcock B. P. et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database // Nucleic acids research. – 2023. – Т. 51. – № D1. – С. D690-D699. DOI: 10.1093/nar/gkac920.
10. Poirel L., Jayol A., Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes // Clinical microbiology reviews. – 2017. – Т. 30. – №. 2. – С. 557-596. DOI: 10.1128/cmr.00064-16.
11. Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации / Домонова Э.А., Творогова М.Г., Подколзин А.Т. [и др.]. Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 2021. – 112 с. DOI: 10.36233/978-5-6045286-6-2.

16. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Температурный диапазон



Серия набора



Хрупкое, обращаться осторожно



Дата изготовления



Использовать до



Не допускать воздействия солнечного света



Содержимого достаточно для проведения *<n>* тестов