

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека


А.В. Горелов

«14» декабря 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс[®] MDR A.b.-OXA-FL

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	15
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	15
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	17
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	17
ФОРМА 1 (ГК-экспресс и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F)	18
СОСТАВ	18
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	18
А. Подготовка проб для амплификации	19
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	20
В. Анализ и интерпретация результатов	20
ФОРМА 2 (ГК-экспресс и «ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	25
СОСТАВ	25
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	25
А. Подготовка проб для амплификации	25
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	26
В. Анализ и интерпретация результатов	27
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	31
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	32
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхо-альвеолярный лаваж
ВКО	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
MDR	- Полирезистентность (Multidrug-resistance)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL предназначен для качественного определения генов OXA-карбапенемаз групп OXA-23-подобных, OXA-58-подобных и OXA-40-подобных (характерных для ацинетобактеров) и генов-маркеров *Acinetobacter baumannii* (генов OXA-51-подобных карбапенемаз) в образцах бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала (аспират из трахеи, БАЛ, кровь, ликвор, мокрота, моча, раневое отделяемое) на плотную или жидкую питательную среду, методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Детекцию генов OXA-карбапенемаз указанных групп проводят с целью выявления штаммов ацинетобактеров, резистентных к β-лактамам антибиотикам группы карбапенемов. Выявление генов-маркеров *Acinetobacter baumannii* (генов OXA-51-подобных карбапенемаз) служит для обнаружения данного микроорганизма. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов

всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования образцов бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала, взятого от лиц с клиническими и/или лабораторными признаками инфекций различной локализации, в первую очередь, инфекций, вызванных *A.baumannii* и связанных с оказанием медицинской помощи.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО¹) и одновременной амплификации участков генов ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров и ДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют

¹ ВКО входит в состав реагента ГК-экспресс.

флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 5 реакций – амплификация ДНК генов-маркеров *A. baumannii* (генов ОХА-51-подобных карбапенемаз), генов ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров групп ОХА-23-подобных, ОХА-58-подобных и ОХА-40-подобных, а также амплификация последовательности ВКО. Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень (группа генов карбапенемаз)	ДНК <i>A.baumannii</i>	OXA-23-подобные	OXA-58-подобные	OXA-40-подобные	ДНК ВКО
Область амплификации	участок гена группы <i>blaOXA-51-like</i>	участок гена группы <i>blaOXA-23-like</i>	участок гена группы <i>blaOXA-58-like</i>	участок гена группы <i>blaOXA-40-like</i>	искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Форма 2: ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1, 2 предназначены для проведения исследования образцов бактериальных культур, полученных при посеве различных видов нативного биоматериала на жидкую или плотную питательную среду.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Бактериальные культуры, полученные путем посева биологического материала на жидкую или плотную ² питательную среду	согласно Приложению 1	ГК-экспресс	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, FRT-L	5x10 ⁵

² Для бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на плотную питательную среду, указана чувствительность в отношении суспензии бактериальных клеток в реагенте ГК-экспресс.

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов, а также геномной ДНК человека:

1. Штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США) в концентрации не менее 1×10^7 ГЭ/мл: *Acinetobacter lwoffii* ATCC® 17925™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Pseudomonas stutzeri* ATCC® 39524™, *Pseudomonas putida* ATCC® 47054™, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 13637™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Citrobacter freundii* ATCC® 8090™, *Serratia marcescens* ATCC® 14756™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 49907™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Streptococcus anginosus* ATCC® 9895™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25238™, *Rhodococcus equi* ATCC® 6939™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Corynebacterium minutissimum* ATCC® 23348™, *Corynebacterium jeikium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium xerosis* ATCC® 373™, *Hemophilis parainfluenzae* ATCC® 7901™.

2. ДНК человека в концентрации 1 мг/мл.

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

При тестировании изолятов *Acinetobacter baumannii*, у которых отсутствовали фенотипические признаки продукции карбапенемаз, неспецифических реакций выявлено не было,

т.е. был получен отрицательный результат детекции генов ОХА-карбапенемаз групп ОХА-23-подобных, ОХА-58-подобных и ОХА-40-подобных и положительный результат детекции генов-маркеров *Acinetobacter baumannii*.

Информация об интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость, воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой смесь стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *A.baumannii*, ДНК *blaOXA-23*, ДНК *blaOXA-40* и ДНК *blaOXA-58*, с концентрацией 1×10^6 копий/мл каждого, в качестве отрицательного образца был использован реагент ГК-экспресс. Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

АмплиСенс® MDR A.b.- OXA-FL	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов с ожидаемыми, %	Количество образцов	Совпадение результатов с ожидаемыми, %
Форма 1	Положительные	30	100	60	100
	Отрицательные	30	100	60	100
Форма 2	Положительные	30	100	60	100
	Отрицательные	30	100	60	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL		Результаты применения референтного ³ метода	
			положи- тельных	отрица- тельных
Бактериальные культуры, полученные путем посева биологического материала на жидкую или плотную питательную среду	Всего исследовано 220 образцов	положительных	100	0
		отрицательных	0	120

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁵ , (с доверительной вероятностью 95 %)
Бактериальные культуры, полученные путем посева биологического материала на жидкую или плотную питательную среду	100 (96,4-100) %	100 (97-100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и

³ В качестве референтного метода использовались культуральные методы исследования и секвенирование участков генома.

⁴ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁵ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне 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 реагенты⁶, упаковку⁶, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁷. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При

⁷ Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

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

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
2. Петли бактериологические, стерильные (например, Nuova Aptaca, Италия, или аналогичные).
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
7. Автоматические дозаторы переменного объема (например,

ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

8. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
9. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

13. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
15. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
16. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
17. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
18. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
19. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
20. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
21. Холодильник от 2 до 8 °С.
22. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки

по МУ 1.3.2569-09.

23. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

24. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» FRT-100 F:

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

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

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

25. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

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

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

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

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

30. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»,

имеющий 5 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).

31. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
32. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
33. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы бактериальных культур, полученные путем посева биологического материала (аспират из трахеи, БАЛ, кровь, ликвор, мокрота, моча, раневое отделяемое) на жидкую или плотную питательную среду.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на плотную питательную среду, не требуют предварительной подготовки.

Допускается приготовление суспензии бактериальных клеток в PBS-буфере или в 0,9 % растворе натрия хлорида. Для этого внести около 10^7 - 10^9 бактериальных клеток, взятых петлей или стерильным наконечником, в подготовленную пробирку с 500 мкл PBS-буфера или 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученную суспензию использовать для дальнейшей работы.

Образцы бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на жидкую питательную среду, требуют предварительной подготовки.

Перенести от 100 до 250 мкл культуры в жидкой питательной среде в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл (с помощью одноразовой пастеровской пипетки или автоматического дозатора с наконечником с фильтром). Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Используя вакуумный отсасыватель,

полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра. Экстракцию ДНК проводить из полученного осадка.

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

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

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были протестированы образцы бактериальных культур и смеси стандартных образцов предприятия без добавления и с добавлением 15 мг агаризованной питательной среды (кровяной агар, LB-агар) или 25 мкл жидкой питательной среды (LB) (см. табл. 6).

Для тестирования использовали бактериальные культуры *A. baumannii*, а также смеси стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *A. baumannii*, ДНК *blaOXA-23*, ДНК *blaOXA-40* и ДНК *blaOXA-58*, с концентрацией 5×10^5 копий/мл каждого.

Таблица 6

Потенциальный интерферент	Содержание в образце	Наличие интерференции
Кровяной агар (blood sheep agar)	15 мг	Не обнаружено
LB-агар (LB-agar)	15 мг	Не обнаружено
Жидкая питательная среда (LB)	25 мкл	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из образцов бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на жидкую или плотную питательную среду, используется реагент **ГК-экспресс** в соответствии с **Приложением 1**.

ФОРМА 1 (ГК-экспресс и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F)**СОСТАВ**

ГК-экспресс – реагент для экстракции ДНК из образцов бактериальных культур, полученных при посеве исследуемого материала на жидкую или плотную питательную среду.

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ГК-экспресс	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	6 пробирок

Реагент рассчитан на проведение экстракции 120 проб, включая контроли.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации участков генов ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL Ab-ОХА	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ПКО-1 Ab-ОХА	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в

режиме «реального времени».

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL Ab-OXA**, **5 мкл ПЦР-буфера-В** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL Ab-OXA**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL Ab-OXA**, **ПЦР-буфером-В** и полимеразой (**TaqF**), осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL Ab-OXA**, **ПЦР-буфера-В** и полимеразы (**TaqF**), осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл** проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ПКО-1 Ab-OXA**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной как образец ОК (см. Приложение 1).
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с

реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7).

Таблица 7

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-В»

Цикл	Приборы роторного типа ⁸			Приборы планшетного типа ⁹		
	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	35	95	5 с	35
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5**.

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для

⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем

⁹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>A.baumannii</i>	гены карбапенемаз группы ОХА-23-подобных	гены карбапенемаз группы ОХА-58-подобных	гены карбапенемаз группы ОХА-40-подобных	ДНК ВКО

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

- ДНК *A.baumannii* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t , не превышающее граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна однократно пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- ДНК *A.baumannii* **не обнаружена**, если для данной пробы значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t , не превышающее граничное значение;
- гены приобретенных ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров групп ОХА-23-подобных и/или ОХА-58-подобных, и/или ОХА-40-подобных **обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Cy5, соответственно, определено значение C_t , не превышающее граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна однократно пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- гены приобретенных ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров групп ОХА-23-подобных и/или ОХА-58-подобных, и/или ОХА-

40-подобных **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Cy5, соответственно, не определено (отсутствует) значение C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или значение C_t превышает граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t , не превышающее граничное значение;

- результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5 не определено (отсутствует) значение C_t или оно превышает граничное значение, и по каналу для флуорофора Cy5.5 значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает граничное значение. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК;
- результат анализа **невалидный**, если для исследуемого образца бактериальной культуры, по результатам бактериологического анализа содержащего *A.baumannii*, отсутствуют значения пороговых циклов C_t по каналам для флуорофоров JOE, ROX и Cy5, и по каналу для флуорофора FAM значение C_t также отсутствует или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t , не превышающее граничное значение. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 9 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Sy5	Sy5.5
K+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 9) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Sy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
 - б) по каналу для флуорофора Sy5.5 значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что OK не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых мишеней, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла по одному из каналов для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5, при этом на графике флуоресценции по этому каналу 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 амплификацию и детекцию для этого образца. При повторном анализе ожидается получение отрицательного результата по этому каналу.

ФОРМА 2 (ГК-экспресс и «ПЦР-комплект» вариант FRT-L)**СОСТАВ**

ГК-экспресс – реагент для экстракции ДНК из образцов бактериальных культур, полученных при посеве исследуемого материала на жидкую или плотную питательную среду.

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ГК-экспресс	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	6 пробирок

Реагент рассчитан на проведение экстракции 120 проб, включая контроли.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участков генов ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл
ПКО-1 Ab-OXA	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью **Ab-OXA-Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество

контрольных образцов см. в п. 3).

2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
3. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл ПКО-1 Аб-ОХА**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной как образец ОК (см. Приложение 1).
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смеси внести **25 мкл К–**.

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

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 10).

Таблица 10

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-В»

Цикл	Приборы роторного типа ¹⁰			Приборы планшетного типа ¹¹		
	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	35	95	5 с	35
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5**.

¹⁰ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем

¹¹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Таблица 11

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>A.baumannii</i>	гены карбапенемаз группы OXA-23-подобных	гены карбапенемаз группы OXA-58-подобных	гены карбапенемаз группы OXA-40-подобных	ДНК ВКО

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

– ДНК *A.baumannii* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t , не превышающее граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна однократно пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;

- ДНК *A.baumannii* **не обнаружена**, если для данной пробы значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t , не превышающее граничное значение;
- гены приобретенных ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров групп ОХА-23-подобных и/или ОХА-58-подобных, и/или ОХА-40-подобных **обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Cy5, соответственно, определено значение C_t , не превышающее граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна однократно пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- гены приобретенных ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров групп ОХА-23-подобных и/или ОХА-58-подобных, и/или ОХА-40-подобных **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Cy5, соответственно, не определено (отсутствует) значение C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или значение C_t превышает граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t , не превышающее граничное значение;
- результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5 не определено (отсутствует) значение C_t или оно превышает граничное значение, и по каналу для флуорофора Cy5.5 значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает граничное значение. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК;
- результат анализа **невалидный**, если для исследуемого образца бактериальной культуры, по результатам бактериологического анализа содержащего *A.baumannii*, отсутствуют значения пороговых циклов C_t по каналам для флуорофоров JOE, ROX и Cy5, и по каналу для флуорофора FAM значение C_t также отсутствует или превышает указанное граничное значение, а в таблице

результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t , не превышающее граничное значение. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
К+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по

выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

б) по каналу для флуорофора Cy5.5 значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых мишеней, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла по одному из каналов для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5, при этом на графике флуоресценции по этому каналу 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 амплификацию и детекцию для этого образца. При повторном анализе ожидается получение отрицательного результата по этому каналу.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL Ab-OXA, ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL Ab-OXA, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Ab-OXA хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru¹².

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ
«Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.В. Ржевская

¹² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно
для проведения п-
количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для
диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции
по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия
солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги



Осторожно! Обратитесь к
инструкции по применению

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов с использованием реагента ГК-экспресс

Порядок работы

1. Включить термостат и установить температуру 70 °С.

При анализе образцов бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на плотную питательную среду

2. Подготовить необходимое количество пустых пробирок, включая пробирку отрицательного контроля (ОК), и промаркировать их.

3. Внести в каждую пробирку по 250 мкл реагента ГК-экспресс¹³.

4. В пробирку с реагентом ГК-экспресс внести около 10^7 - 10^9 бактериальных клеток, взятых петлей или стерильным наконечником.

5. При анализе образцов суспензии бактериальных клеток в PBS-буфере или в 0,9 % растворе натрия хлорида в пробирки с реагентом ГК-экспресс внести по 20 мкл суспензии бактериальных клеток, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

6. В пробирку отрицательного контроля (ОК) ничего, кроме реагента ГК-экспресс, не добавлять. Перейти к п.9.

При анализе образцов бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на жидкую питательную среду

7. В пробирки, содержащие осадок бактериальных клеток, внести по 250 мкл реагента ГК-экспресс, используя для каждой пробирки отдельный наконечник с фильтром.

8. Промаркировать одну дополнительную пробирку отрицательного контроля (ОК) и внести в нее 250 мкл реагента ГК-экспресс и 20 мкл используемой жидкой питательной среды. Перейти к п.9.

9. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости на вортексе (2-3 сек).

10. Содержимое пробирок прогреть 10 мин при 70 °С в термостате, перемешать.

¹³ ВКО входит в состав реагента ГК-экспресс.

11. После окончания инкубации перемешать и центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 12 тыс g (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Надосадочная жидкость содержит ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

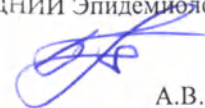
ДНК-пробы могут храниться в течение недели при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

ВНИМАНИЕ! При повторном ПЦР-исследовании проб ДНК содержимое пробирок необходимо перемешать на вортексе и повторить центрифугирование в соответствии с п.11.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 35

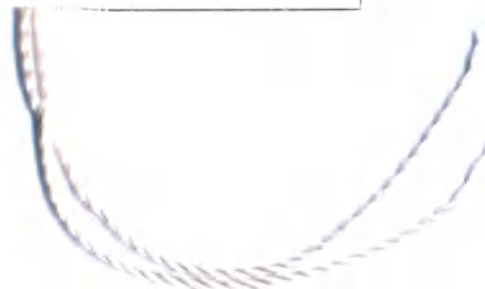
тридцать пять лист 86

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



А.В. Горелов

20 19 г.





Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru

Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Форма 1:  HN-3871-1

Форма 2:  HN-3872-1-4



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123, город
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



 30.08.19

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.

ИНСТРУКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО) – в каждом образце¹.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Бактериальные культуры, полученные на плотной питательной среде

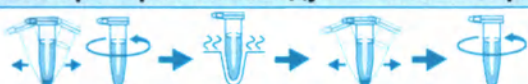
Образец/реагент	Объем	Действие
ГК-экспресс	250 мкл	добавить в каждую пробирку
Бактериальные клетки	$10^7 - 10^9$ клеток	добавить в пробирки для исследуемых образцов
Суспензия бактериальных клеток	20 мкл	

В пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции) ничего, кроме реагента ГК-экспресс, не добавлять!

Бактериальные культуры, полученные на жидкой питательной среде

Образец/реагент	Объем	Действие
ГК-экспресс	250 мкл	добавить в каждую пробирку с осадком бактериальных клеток
Жидкая питательная среда + ГК-экспресс	20 мкл + 250 мкл	добавить в пробирку для ОК

Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:



- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли;
- прогреть **10 мин** при **70 °С**, перемешать на вортексе;
- центрифугировать **1 мин** при **12 тыс g**

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК

ВНИМАНИЕ! При повторном ПЦР-исследовании проб ДНК содержимое пробирок перемешать на вортексе и повторить центрифугирование.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

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

Контроли: 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (К).

Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.

В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL Ab-OXA	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-B	$5 \cdot (N+K+1)$	
ДНК-полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

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

Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных проб.

Добавить по 15 мкл

Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
----------------------------------	-------------------

Добавить по 10 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной как образец ОК	в пробирку для ОК
КО-1 Ab-OXA	в пробирку для K+
	в пробирку для K-

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

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

Контроли: 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (К).

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью Ab-OXA-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

Добавить по 25 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной как образец ОК	в пробирку для ОК
КО-1 Ab-OXA	в пробирку для K+
	в пробирку для K-

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

Цикл	Программа «АмплиСенс-В»							
	Приборы роторного типа				Приборы планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	35	95	5 с	–	35
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5		60	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

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

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортке.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>A.baumannii</i>	гены карбапенемаз группы OXA-23- подобных	гены карбапенемаз группы OXA-58- подобных	гены карбапенемаз группы OXA-40- подобных	ДНК ВКО

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

Пролито, пронумеровано и скреплено печатью: 3
(три) лист а

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



« 18 » 12 20 18 г.

М.п.

А.В. Горелов

ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3А тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов
АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Форма 1	LOT 29.10.19	 2019-10-29
		 2021-01-29

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный контроль экстракции (ПК) – ГК-экспресс + ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX И Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль экстракции (ОК) – ГК-экспресс	Отсутствуют значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX И Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Положительный контроль ПЦР (К+) – ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct менее граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 и Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль ПЦР (К-) – К-	Отсутствуют значения Ct по всем каналам детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ГК-экспресс	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПЦР-смесь-FL Ab-OXA	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ПКО-1 Ab-OXA	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разуконкомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL Ab-OXA, ПЦР-буфера-В и полимераза (TaqF). ПЦР-смесь-FL Ab-OXA, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Ab-OXA хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи



Руководитель ГК

(подпись)

(Козлова Е.А.)
(Ф.И.О.)

ВЕРНО

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

А.В. Горелов

« 19 » 12 20 19 г.

Форма 1: REF HN-3871-1 Форма 2: REF HN-3872-1-4

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов
АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Форма 1	LOT A29.10.19	 2019-10-29
		 2021-01-29

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный контроль экстракции (ПК) – ГК-экспресс + ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль экстракции (ОК) – ГК-экспресс	Отсутствуют значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Положительный контроль ПЦР (К+) – ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct менее граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 и Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль ПЦР (К-) – К-	Отсутствуют значения Ct по всем каналам детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации	
ГК-экспресс	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
ПЦР-смесь-FL Ab-OXA	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1	
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	
ПКО-1 Ab-OXA	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует		2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разуконплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL Ab-OXA, ПЦР-буфера-В и полимераза (TaqF). ПЦР-смесь-FL Ab-OXA, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Ab-OXA хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

29.10.19

Руководитель ПК



(Козлова Е.А.)
(Ф.И.О.)

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

« 18 » 12 2015 г.



А.В. Горелов

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов
АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Форма 2	LOT 29.10.19	 2019-10-29
		 2021-01-29

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный контроль экстракции (ПК) – ГК-экспресс + ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль экстракции (ОК) – ГК-экспресс	Отсутствуют значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Положительный контроль ПЦР (К+) – ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct менее граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 и Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль ПЦР (К-) – К-	Отсутствуют значения Ct по всем каналам детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ГК-экспресс	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПЦР-смесь-FL Ab-OXA	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ПКО-1 Ab-OXA	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разуконплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL Ab-OXA, ПЦР-буфера-В и полимерызы (TaqF). ПЦР-смесь-FL Ab-OXA, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Ab-OXA хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи



Руководитель ПК

(подпись)

(Козлова Е.А.)
(Ф.И.О.)

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



А.В. Горелов

« 13 » 12 2019 г.

Форма 1: REF HN-3871-1, Форма 2: REF HN-3872-1-4

**ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3А тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

**Набора реагентов
АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL**

Форма 2	LOT A29.10.19	 2019-10-29
		 2021-01-29

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный контроль экстракции (ПК) – ГК-экспресс + ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX И Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль экстракции (ОК) – ГК-экспресс	Отсутствуют значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX И Cy5. Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
Положительный контроль ПЦР (К+) – ПКО-1 Ab-OXA	Определены значения Ct менее граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 и Cy5.5	соответствует
Отрицательный контроль ПЦР (К-) – К-	Отсутствуют значения Ct по всем каналам детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ГК-экспресс	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПЦР-смесь-FL Ab-OXA	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ПКО-1 Ab-OXA	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разуконкомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL Ab-OXA, ПЦР-буфера-В и полимераза (TaqF). ПЦР-смесь-FL Ab-OXA, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Ab-OXA хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Реагент ГК-экспресс, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь Ab-OXA-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

29.10.19

Руководитель



(Козлова Е.А.)
(Ф.И.О.)

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ВЕРНО

А.В. Горелов

« 18 » 12 20 19 г.

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Форма 1 **REF** HN-3871-1Форма 2 **REF** HN-3872-1-4**LOT** 29.10.19**Настройки для приборов роторного типа**

Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate / Gain Optimisation / Опт.уровня сигн.	Threshold / Порог	Dynamic tube / Динамич.фон	Slope Correct / Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
JOE/Yellow	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
ROX/Orange	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
Cy5/Red	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
Cy5.5/Crimson	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %

При использовании ротора на 36 лунок при запуске включить опцию **15 mkl с добав. воска / 15 µL oil layer volume**, модифицирующую термоциклирование.

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96, «ДТ-96», «ДТпрайм»

Примечание (для прибора CFX96) – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**.

Канал	Threshold/Порог
FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5	Устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ в последнем цикле амплификации

«ДТ-96», «ДТпрайм»

Метод	Тип анализа	Каналы	Критерий положительного результата ПЦР	Нижняя граница/порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Пороговый (Ct)	Ct(Cp) для всех каналов	Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5	90 %	5	10	Не использовать	Включено

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Приборы роторного типа					Приборы планшетного типа				
	Канал для флуорофора									
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
К+	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31
К-	Ct отсутствует					Ct отсутствует				
ОК	Ct отсутствует				34	Ct отсутствует				35
Исследуемые образцы	33	33	33	33	34	34	34	34	34	35

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Форма 1 **REF** HN-3871-1Форма 2 **REF** HN-3872-1-4**LOT** A29.10.19**Настройки для приборов роторного типа**

Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate / Gain Optimisation / Опт.уровня сигн.	Threshold / Порог	Dynamic tube / Динамич.фон	Slope Correct / Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
JOE/Yellow	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
ROX/Orange	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
Cy5/Red	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %
Cy5.5/Crimson	от 5 до 10 FI	0,1	включена	включена	5-15 %

При использовании ротора на 36 лунок при запуске включить опцию **15 mkl с добав. воска / 15 µL oil layer volume**, модифицирующую термоциклирование.

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96, «ДТ-96», «ДТпрайм»

Примечание (для прибора CFX96) – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**.

Канал	Threshold/Порог
FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5	Устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ в последнем цикле амплификации

«ДТ-96», «ДТпрайм»

Метод	Тип анализа	Каналы	Критерий положительного результата ПЦР	Нижняя граница/порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Пороговый (Ct)	Ct(Cp) для всех каналов	Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5	90 %	5	10	Не использовать	Включено

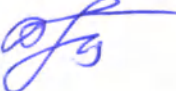
Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Приборы роторного типа					Приборы планшетного типа				
	Канал для флуорофора									
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
К+	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31
К-	Ct отсутствует					Ct отсутствует				
ОК	Ct отсутствует				34	Ct отсутствует				35
Исследуемые образцы	33	33	33	33	34	34	34	34	34	35

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
(96а) лист а

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

  А.В. Горелов

« 18 » 18 20 18 г.
М.П.