

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления генов резистентности к макролидным антибиотикам *ErmA*, *ErmC* и *MsrA* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ARG макролиды *ErmA/ErmC/MsrA*»

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотикорезистентность - отсутствие чувствительности бактерий к антимикробным препаратам, возникающее в результате спонтанных мутаций в процессе репликации ДНК либо путем передачи измененного генетического материала в виде плазмид или хромосомных фрагментов другим штаммам и видам бактерий. В присутствии антибиотика резистентные штаммы бактерий обладают селективным преимуществом перед чувствительными микроорганизмами, что способствует их быстрому распространению и миграции по всему миру. Основными причинами возникновения устойчивости к антибактериальным препаратам (АБП) являются неправильное применение противомикробных препаратов, а также неудовлетворительные меры профилактики инфекций и инфекционного контроля в медицинских учреждениях и на сельскохозяйственных предприятиях.

Антибиотикорезистентность является глобальной проблемой для практического здравоохранения. Бактерии, нечувствительные к лекарственным препаратам, чаще всего встречаются при нозокомиальных инфекциях, что приводит к увеличению длительности госпитализации, тяжести заболевания и ухудшению прогноза для пациентов. Некоторые штаммы бактерий способны развивать мультирезистентность (устойчивость более чем к трем классам АБП) и панрезистентность (нечувствительность ко всем классам АБП).

Макролиды характеризуются минимальной токсичностью и широко применяются для лечения внебольничной пневмонии, синусита, ангины, при инфекциях верхних дыхательных путей и обострении хронического бронхита, а также при непереносимости пенициллинов и

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР-наборов Трухиной А.В.

цефалоспоринов. Основной мишенью действия макролидов является 50S-субъединица рибосомы. У большинства бактерий устойчивость возникает в результате метилирования аденина с помощью фермента метилазы в 23S-субъединице рибосомальной РНК, входящей в состав 50S-субъединицы рибосомы. Известно около 20 генов *Erm*, кодирующих метилазы; они ассоциированы с транспозонами и могут локализоваться как на плазмидах, так и на хромосомах. Гены *ErmA* и *ErmC* выявляются у *Staphylococcus spp.*, в том числе метициллинрезистентных, а также у *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus pneumoniae*, что связывают со значительным увеличением объема применения азитромицина, кларитромицина и рокситромицина в качестве препаратов выбора.

Известно, что макролиды имеют общий антибактериальный спектр и похожий способ антибактериального действия с линкозамидами и стрептограминами. Макролиды, линкозамиды и стрептограммины имеют перекрывающиеся участки прикрепления на рибосоме, следовательно, резистентность ко всем трем группам препаратов наблюдается перекрестная. Так, гены *ErmA* и *ErmC* наряду с резистентностью к макролидам обуславливают также резистентность к линкозамидам.

Резистентность к антибиотикам реализуется не только через механизмы модификации мишени, но и через эффлюкс антибиотика (активное выведение из клетки). Ген *MsrA* кодирует АТФ-транспортер, который выводит макролиды и стрептограмин В из клетки, используя энергию гидролиза АТФ. *MsrA* придает устойчивость к 14-15-членным макролидам и стрептограмминам, но не к линкозамидам или 16-членным макролидам. Достаточно одной копии гена для обеспечения устойчивости к эритромицину. Это подчеркивает важность обнаружения гена *MsrA*, поскольку его способность функционировать независимо от других генов может позволить ему быстро распространяться посредством горизонтальной передачи. Ген *MsrA* идентифицирован только у *Staphylococcus spp.*

Детекция генов *ErmA*, *ErmC* и *MsrA* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени позволяет выявлять возможную индуцируемую резистентность к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В в кратчайшие сроки для обеспечения своевременного выбора антибактериальной терапии, а также для мониторинга резистентных штаммов в лечебно-профилактических учреждениях.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления генов резистентности к макролидным антибиотикам *ErmA*, *ErmC* и *MsrA* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ARG макролиды *ErmA/ErmC/MsrA*» предназначен для качественного выявле-

ния генов резистентности к макролидным антибиотикам *ErmA*, *ErmC* и *MsrA* в ДНК, выделенной из клинических образцов (соскоб со слизистой, моча, мокрота, аспират дыхательных путей, бронхоальвеолярный лаваж, раневое отделяемое, ликвор, биоптаты), смывов с поверхностей, гемокультур и бактериальных культур методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор может быть использован при подборе антибактериального препарата для повышения эффективности антибактериальной терапии, а также для определения профиля устойчивости к антибактериальным препаратам у внутрибольничных штаммов бактерий в рамках мониторинга нозокомиальных инфекций в медицинских учреждениях.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК целевых генов в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК целевых генов, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'–3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством целевой ДНК в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением из исследуемых образцов совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание</i>	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	2 пробирки по 1 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	2 пробирки по 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	96 пробирок
Оптическая пленка	1,5 листа
Вкладыш со штрих-кодом	1 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов (соскобов со слизистой, мочи), смывов с поверхностей, бактериальных культур с использованием наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор», «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг» производства АО «Вектор-Бест»; из клинических образцов мокроты, аспирата дыхательных путей, бронхоальвеолярного лаважа, ликвора, биоптатов с использованием наборов «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг»; из гемокультур, раневого отделяемого, с использованием набора «РеалБест экстракция 100».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа с термоблоком для пробирок объемом 0,2 мл и каналами детекции «ROX», «FAM», «HEX», «Cy5»: «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай) или их аналогами, зарегистрированными в установленном порядке в РФ.

Запуск программы амплификации и анализ результатов может производиться с помощью программного обеспечения «GP.РеалБест Диагностика» (размещена на сайте <http://www.vector-best.ru>).

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

Показания к применению. Набор может быть использован при подборе антибактериального препарата для повышения эффективности антибактериальной терапии, а также для определения профиля устойчивости к антибактериальным препаратам у внутрибольничных штаммов бактерий в рамках мониторинга нозокомиальных инфекций в медицинских учреждениях.

Противопоказания. Не применимо. Изделие предназначено для клинической лабораторной диагностики.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность.

За аналитическую чувствительность принята величина концентрации целевой ДНК, для которой при экспериментальной проверке на двух сериях набора на 72 повторях для каждой серии с использованием амплификаторов «CFX96», «ДТпрайм», «FLUORITE» и наборов для выделения НК «РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор», «РеалБест экстракция 100», и «РеалБест УниМаг» был получен положительный результат в 100% случаев.

Набор гарантированно выявляет гены резистентности к макролидным антибиотикам *ErmA*, *ErmC* и *MsrA* в концентрации 250 копий в ПЦР-пробе (соответствует 3×10^4 копий/мл исходного образца при выделении ДНК с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор» и 1×10^4 копий/мл исходного образца при выделении ДНК с помощью наборов «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг»).

3.2. Аналитическая специфичность.

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей микроорганизмов, не имеющих резистентности к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В, которые могут присутствовать в клинических образцах. Возможность перекрестных реакций исключена.

Аналитическая специфичность выявления генов *ErmA*, *ErmC* и *MsrA* была подтверждена отсутствием перекрестных ложноположительных сигналов при анализе образцов, содержащих ДНК микроорганизмов, которые могут встретиться в биоматериале: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Corynebacterium propinquum*, *Lactobacillus spp.*, *Citrobacter imitans*, *Moraxella catarrhalis*, *Serratia marcescens*, *Elizabethkingia anopheles*, *Raoultella planticola*, *Rothia mucilaginosa*, а также штаммах *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus spp.*, не имеющих резистентности к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В, в концентрации 10^6 - 10^7 копий/мл. Перекрестно реагирующих ДНК по данным, полученным при исследованиях в рамках клинико-лабораторных испытаний, обнаружено не было.

3.3. Диагностическая чувствительность:

- диагностическая чувствительность выявления гена *ErmA*: клинические испытания, проведенные на 55 положительных образцах, содержащих *ErmA*, показали 100 % чувствительность (интервал 93,47 - 100%, с доверительной вероятностью 95 %);
- диагностическая чувствительность выявления гена *ErmC*: клинические испытания,

проведенные на 53 положительных образцах, содержащих *ErmC*, показали 100 % чувствительность (интервал 93,24 - 100%, с доверительной вероятностью 95 %);

- диагностическая чувствительность выявления гена *MsrA*: клинические испытания, проведенные на 49 положительных образцах, содержащих *MsrA*, показали 100 % чувствительность (интервал 92,73- 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.4. Диагностическая специфичность:

- диагностическая специфичность выявления гена резистентности к макролидным антибиотикам *ErmA*: клинические испытания, проведенные на 153 отрицательных образцах, не содержащих *ErmA*, показали 100 % специфичность (интервал 97,55 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- диагностическая специфичность выявления гена резистентности к макролидным антибиотикам *ErmC*: клинические испытания, проведенные на 155 отрицательных образцах, не содержащих *ErmC*, показали 100 % специфичность (интервал 97,58 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- диагностическая специфичность выявления гена резистентности к макролидным антибиотикам *MsrA*: клинические испытания, проведенные на 159 отрицательных образцах, не содержащих *MsrA*, показали 100 % специфичность (интервал 97,64 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Повторяемость и воспроизводимость.

При тестировании на одной серии набора, на одном оборудовании, одним оператором, в одной лаборатории 3 образцов в 8 повторях каждый повторяемость составила 100%, коэффициент вариации *Ct* не более 3%.

При тестировании в шести независимых постановках тремя разными операторами на двух сериях набора в двух лабораториях 3 образцов в 8 повторях каждый внутривыставочная, межвыставочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость, межлабораторная воспроизводимость результатов составила 100 %. Коэффициент вариации *Ct* не более 4 %.

3.6. Потенциально-интерферирующие вещества.

Интерферирующие вещества исследовали на модельных образцах клинического материала путем внесения известных количеств интерферентов. Показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах соскобов эпителиальных клеток (кровь и мочина до 0,5%), образцах мочи (билирубин до 0,2 мг/мл (350 мкмоль/л), глюкоза до 55 ммоль/л, белок до 3 г/л) и гемокультурах (гемоглобин до 5 г/л) на результаты анализа.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению генов *ErmA*, *ErmC* и *MsrA*, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. ПКО и ОКО содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые клас-

сифицируются и уничтожаются (утилизируются) 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, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа с термоблоком для пробирок объемом 0,2 мл (с каналами детекции: «FAM», «HEX», «ROX», «Cy5»): «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай), или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке в РФ;

– ПЦР-бокс (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-"Ламинар-С", ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2T», BioSan, Латвия или «Eppendorf MixMate», Eppendorf AG, Германия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, Biohit, Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, Sartorius, Германия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», Ansell HealthCare, Германия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, SSI, США);

– контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – МК-01», КМ-ПРОЕКТ, Россия);

– нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения НК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа используется ДНК, выделенная из клинических образцов согласно инструкциям по применению соответствующих наборов серии «РеалБест». Наборы, подходящие

для каждого вида клинических образцов, указаны в таблице:

Тип образца	Набор для выделения НК		
	«РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор»	«РеалБест экстракция 100»	«РеалБест УниМаг»
Соскоб со слизистой	+	+	+
Раневое отделяемое	–	+	–
Моча	+	+	+
Мокрота	–	+	+
Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)	–	+	+
Аспират дыхательных путей	–	+	+
Биоптаты	–	+	+
Ликвор	–	+	+
Смывы с поверхностей	+	+	+
Гемокультура	–	+	–
Бактериальная культура	+	+	+

Образцы раневого отделяемого, смывов с поверхностей, забранные с помощью одноразовых стерильных зондов в пробирки с «Транспортным раствором» производства АО «Вектор-Бест», тщательно перемешать. 100 мкл полученной суспензии использовать для выделения ДНК.

Для образцов мокроты необходимо предварительно провести процедуру подготовки к выделению нуклеиновых кислот. К образцу биоматериала добавить равный объем 95% этилового спирта, тщательно перемешать, выдержать при температуре (18–26) °С 10 минут. Еще раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения ДНК. Не захватывать комки слизи!

Образцы БАЛ, аспиратов дыхательных путей должны быть предварительно обработаны: отобрать 1 мл биоматериала в отдельную пробирку и центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 10 минут. Затем отобрать и удалить 0,8 мл надосадочной жидкости, осадок ресуспендировать в оставшейся жидкости. Если образец содержит слизь, провести процедуру обработки, как описано для образцов мокроты. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения ДНК.

Образцы биоптатов предварительно гомогенизировать при помощи лабораторного гомогенизатора согласно соответствующей инструкции по применению. 100 мкл полученной

суспензии использовать для выделения ДНК.

Образцы гемокультур, бактериальных культур, забранные в пробирки с «Транспортным раствором» производства АО «Вектор-Бест», тщательно перемешать, 100 мкл полученной суспензии использовать для выделения ДНК.

Транспортировать и хранить образцы:

- соскобов со слизистой

при температуре (18–26) °С не более 2 суток;

при температуре (2–8) °С не более 2 недель;

при температуре минус (18–40) °С не более 2 месяцев;

при температуре ниже минус 40°С – длительно.

- мочи

при температуре (18–26) °С не более 2 часов;

при температуре (2–8) °С не более 1 суток.

Допускается хранение клеточных осадков мочи при температуре минус (18–40) °С не более 2 недель.

- раневого отделяемого, мокроты, смывов с поверхностей, гемокультур, бактериальных культур

при температуре (18–26) °С не более 6 часов;

при температуре (2–8) °С не более 3 суток;

при температуре минус (18–40) °С не более 2 недель;

при температуре ниже минус 40°С – длительно.

- БАЛ, аспиратов дыхательных путей, биоптатов, ликвора

при температуре (18–26) °С не более 2 часов;

при температуре (2–8) °С не более 1 суток;

при температуре минус (18–40) °С не более 2 недель;

при температуре ниже минус 40°С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и ОКО, которые являются компонентами данного набора.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18–26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с

ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. ПКО и ОКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС по числу подготовленных образцов, включая контрольные образцы, пронумеровать (если необходимо) и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку с ГРС дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

7.3. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

Для повышения эффективности и скорости смешения компонентов рекомендуется перемешать содержимое пробирок в мини-шейкере с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

При использовании программного обеспечения прибора:

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, фрагментов генов *ErmA*, *ErmC* и *MsrA* и детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

Протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд)*.

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК.

«FAM» – для регистрации процесса амплификации фрагмента гена *ErmA*;

«HEX» – для регистрации процесса амплификации фрагмента гена *ErmC*;

«ROX» – для регистрации процесса амплификации фрагмента гена *MsrA*;

«Cy5» – для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить амплификатор для выполнения заданного протокола.

При использовании программы «GP.РеалБест Диагностика»:

7.9. Запустить программное обеспечение «GP.РеалБест Диагностика».

7.10. Со вкладыша с информацией ввести данные штрих-кода набора.

7.11. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами.

7.12. Запустить программу амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

- нарастание сигнала амплификации фрагмента гена *ErmA* (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ПКО.

- нарастание сигнала амплификации фрагмента гена *ErmC* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

- нарастание сигнала амплификации фрагмента гена *MsrA* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» с C_t , меньшим или равным 32.

Если для ОКО значение C_t по каналам «FAM» и/или «HEX» и/или «ROX» меньше или равно 32, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

8.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять C_t ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1 Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ген *ErmA*, если для этого образца значение Ct по каналу «FAM» больше 32 или не определяется.

Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ген *ErmC*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» больше 32 или не определяется.

Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ген *MsrA*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 32 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ген *ErmA*, если для этого образца значение Ct по каналу «FAM» меньше или равно 32.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ген *ErmC*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» меньше или равно 32.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ген *MsrA*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 32.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте <http://www.vector-best.ru>.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ARG макролиды ЕгтА/ЕгтС/МсгА», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержимого достаточно для проведения n-тестов		Предел температуры
	Код партии		Дата изготовления
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать до....	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

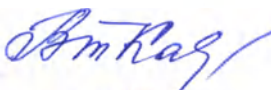
Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

М.П.

 А.В. Трухина

 В.К. Ткачев

 Т.И. Поспелова



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 15 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.

“06” 03 2023 г.

