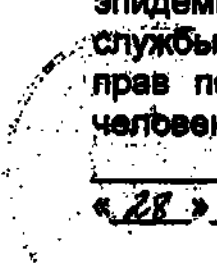


«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

« 28 »

июня

20 24 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для качественного определения ДНК
Aspergillus niger методом изотермической амплификации (ИТ)
AmpliSens® AN-IT

AmpliSens®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК ⁴	15
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
ФОРМА IT-50	18
СОСТАВ.....	18
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	19
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	19
ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	19
А. Подготовка проб для ИТ	19
Б. Проведение ИТ с детекцией в режиме «реального времени»	21
В. Анализ и интерпретация результатов	22
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	25
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	25
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	27

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛЖ	- бронхоальвеолярная лаважная жидкость
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИТ	- изотермическая амплификация
К–	- отрицательный контроль ИТ
МУ	- методические указания
НК	- нуклеиновая кислота
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПК	- положительный контроль экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПВБ	- промывные воды бронхов
ПО	- программное обеспечение
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
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
AmpliSens® AN-IT	- Набор реагентов для качественного определения ДНК <i>Aspergillus niger</i> методом изотермической амплификации (ИТ) AmpliSens® AN-IT
AN	- <i>Aspergillus niger</i>
С+	- положительный контрольный образец
С–	- отрицательный контрольный образец
ИТ	- isothermal amplification

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов AmpliSens® AN-IT предназначен для качественного определения ДНК *Aspergillus niger* в биологическом материале (мокрота, промывные воды бронхов / бронхоальвеолярная лаважная жидкость (ПВБ / БАЛЖ)) методом изотермической амплификации (ИТ) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для ИТ служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Ограничения по применению медицинского изделия в различных популяционных и демографических группах отсутствуют.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала,

полученного от лиц с подозрением на инфицирование *Aspergillus niger*.

Отрицательный результат исследования не исключает возможность инфицирования *Aspergillus niger* и может быть получен при содержании микроорганизма в образце ниже заявленной аналитической чувствительности.

Потенциальные пользователи медицинского изделия: к работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники (например, врач клинко-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант), обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфицирование *Aspergillus niger*.

Отрицательный результат исследования не исключает возможность инфицирования *Aspergillus niger* и может быть получен при содержании микроорганизма в образце ниже заявленной аналитической чувствительности.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной изотермической амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты исследования.

Изотермическая амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Bst-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам

амплифицируемых ДНК-мишеней, что 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.

Амплифицируемые ДНК-мишени и каналы детекции флуоресценции указаны в табл. 1.

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК <i>Aspergillus niger</i>	ДНК ВКО
Область амплификации	CAM (ген кальмодулина)	искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Таблица 2

Характеристика	Форма IT-50
Число реакций амплификации, включая контроли	50
Тип амплификатора	ротаторный и планшетный

Форма IT-50 предназначена для проведения изотермической амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Объем контролей рассчитан на 10 независимых постановок.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Предел обнаружения

Таблица 3

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Предел обнаружения, ГЭ (копий) / мл
Мокрота	100	«РИБО-преп»	1x10 ⁴
Промывные воды бронхов / бронхоальвеолярная лаважная жидкость (ПВБ / БАЛЖ)	100		1x10 ⁴

Примечание – одна копия мишени ДНК *Aspergillus niger* соответствует одному геномному эквиваленту (геному).

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 участок ДНК *Aspergillus niger* (клинические образцы, содержащие ДНК *Aspergillus niger* в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ (копий)/мл, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также геномной ДНК человека:

- *Aspergillus niger* (ATCC® 10535™) в концентрации не более 5×10^6 ГЭ (копий)/мл и не менее 1×10^4 ГЭ (копий)/мл;
- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^5 ГЭ/мл: *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *Bordetella pertussis* ATCC® 9340™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Candida glabrata* ATCC® 2001, *Candida guilliermondii* ATCC® 6260, *Candida krusei* ATCC® 14243™, *Clostridium difficile* ATCC® 9689™, *Clostridium septicum* ATCC® 12464™, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium xerosis* ATCC® 373™, *Eggerthella lenta* ATCC® 43055™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC® 19414™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 9006™, *Haemophilus parainfluenzae* ATCC® 7901™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Listeria grayi* (murrayi) ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC® 25238™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria*

meningitidis ATCC® 13102™ (Serogroup C), *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™ (Serogroup B), *Peptoniphilus anaerobius* ATCC® 27337™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Propionibacterium acnes* ATCC® 11827™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Rhodococcus equi* ATCC® 6939™, *Salmonella enterica* ATCC® 14028™, *Serratia marcescens* ATCC® 14756™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 43300™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 33591™, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 12600™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC® 29970™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 49907™, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 13637™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813™, *Streptococcus equisimilis* ATCC® 12388™, *Streptococcus equi* subsp. *equi* ATCC® 9528™, *Streptococcus mutans* ATCC® 35668™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™, *Streptococcus salivarius* ATCC® 13419™, *Streptococcus uberis* ATCC® 700407™, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC® 17802™, *Vibrio vulnificus* ATCC® 27562™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25240™;

- штаммы из коллекции РКПГ (Российской коллекции патогенных грибов) НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^5 ГЭ/мл: *Candida tropicalis* РКПГ Y-1513/784, *Candida utilis* РКПГ Y-1270/-ЛИА-01, *Candida rugosa* РКПГ Y-1177, *Aspergillus fumigatus* РКПГ F-1248/880-1, *Aspergillus flavus* РКПГ F-1247/1094, *Candida auris* РКПГ Y-1945, *Rhodotorula glutinis* РКПГ Y-985/1111, *Rhizomucor pusillus* РКПГ F-1341/16/904, *Saccharomyces cerevisiae* РКПГ Y-1292/943, *Fusarium oxysporum* РКПГ F 155/4138, *Rhodotorula mucilaginosa* РКПГ Y-988/1119, *Aspergillus sydowii* РКПГ F 1241/797;
- штаммы из коллекции ВКМ (Всероссийской коллекции микроорганизмов) института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (ИБФМ РАН) в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^5 ГЭ/мл:

Aspergillus terreus BKM F-66, *Lichtheimia corymbifera* (syn. *Absidia corymbifera*) BKM F-517, *Aspergillus awamori* BKM F-4632, *Cryptococcus albidus* var. *albidus* (*Naganishia albida*) BKM Y-2223, *Cryptococcus neoformans* BKM Y-2755, *Fusarium solani* BKM F-819, *Mucor plumbeus* BKM F-961, *Mucor indicus* BKM F-1318, *Mucor plumbeus* BKM F-566, *Mucor ramosissimus* BKM F-1229, *Penicillium chrysogenum* BKM F-227, *Penicillium purpurogenum* BKM F-3019, *Rhizopus arrhizus* (*oryzae*) BKM F-619, *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* BKM F-1415, *Rhizopus microsporus* var. *microspores* BKM F-1415;

– ДНК человека в концентрации 10 мкг/мл.

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

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы содержали стандартный образец предприятия с концентрацией ДНК *Aspergillus niger* 5×10^4 ГЭ (копий) / мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент С–.

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 двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы следующие образцы (см. табл. 5):

Таблица 5

Вид исследуемого материала	Количество образцов
Мокрота	50
Промывные воды бронхов / бронхоальвеолярная лаважная жидкость (ПВБ / БАЛЖ)	50
Всего	100

В качестве референтного метода использовался метод секвенирования нового поколения (NGS).

Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Диагностические характеристики набора реагентов AmpliSens® AN-IT

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Мокрота	100 (86,28-100) %	100 (86,28-100) %
Промывные воды бронхов / бронхоальвеолярная лаважная жидкость (ПВБ / БАЛЖ)	100 (86,28-100) %	100 (86,28-100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения молекулярного исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по

запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

ВНИМАНИЕ! В процессе ИТ образуется больше продуктов амплификации, чем в ПЦР, поэтому требуется особая осторожность при утилизации продуктов ИТ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Перечисленные ниже дополнительные материалы и оборудование, относящиеся к категории медицинских изделий и зарегистрированные на территории Российской Федерации или Евразийского экономического союза, не имеют ограничений по совместному использованию с данным набором реагентов, кроме позиций, для которых указаны конкретные примеры.

Взятие исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2 мл.
2. 0,9% раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

3. Емкость (пробирка, контейнер) для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом от 5 до 50 мл, однократного применения, стерильная.

Предварительная подготовка исследуемого материала

4. Реагент для предварительной обработки мокроты (например, реагент для предобработки слизистого материала «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082).
5. Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 15 мл.
6. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Заворачивающиеся крышки к пробиркам.
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл.
9. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
10. Автоматические дозаторы переменного объема.
11. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g.
12. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
13. Центрифуга-вортекс.
14. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16°C.
15. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
16. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

17. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
18. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
19. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
20. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Изотермическая амплификация с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

21. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки 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 – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) планшет на 96 лунок или 384 лунки – при использовании прибора планшетного типа на 96 или 384 лунки соответственно;
 - г) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
22. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл.
 23. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
 24. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс, УФ-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
 25. Центрифуга-вортекс.
 26. Автоматические дозаторы переменного объема.
 27. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (ПУ № ФСЗ 2010/07595)), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (ПУ № ФСЗ 2008/03399)), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (ПУ № ФСР 2007/01250, ПУ № ФСР 2011/10229)).
 28. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 29. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 30. Емкость для сброса наконечников.
 31. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА⁴

Материалом для исследования служат:

- мокрота,
- промывные воды бронхов / бронхоальвеолярная лаважная жидкость (ПВБ / БАЛЖ).

Мокрота

Образцы собирают в одноразовые градуированные завинчивающиеся емкости с широким горлом объемом не менее 30 мл.

Качественным материалом можно считать мокроту, имеющую слизистый или слизисто-гнойный характер. Если пациент не выделяет мокроту или выделяет её только эпизодически и в скудном количестве, то накануне вечером и рано утром в день сбора биологического материала следует дать ему отхаркивающее средство или применить раздражающие ингаляции. При получении индуцированной мокроты в сопроводительном документе необходимо отметить, что материал получен после аэрозольных ингаляций.

Допускается хранение мокроты до проведения предобработки:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Промывные воды бронхов / бронхоальвеолярная лаважная жидкость (ПВБ / БАЛЖ)

Бронхоальвеолярную лаважную жидкость или промывные воды бронхов в объёме от 5 до 50 мл собрать в пробирку или контейнер при проведении бронхоскопии. Пробирку или контейнер плотно закрыть крышкой.

Для контроля контаминации исследуемыми

⁴ См. также «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации» / Домонова Э.А., Творогова М.Г., Подколзин А.Т. [и др.]. Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 2021. 112 с. ISBN 978-5-6045286-6-2, DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-6045286-6-2>, веб-сайт <https://prepcr.crie.ru/>

микроорганизмами или их ДНК рекомендуется провести предварительное взятие смывов с бронхоскопов, подготовленных для проведения процедуры бронхоскопии. С этой целью промыть канал и шланг аппарата 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Полученный смыв перенести в пробирку для последующего тестирования. Пробирку плотно закрыть крышкой.

Допускается хранение промывных вод бронхов / бронхоальвеолярной лаважной жидкости до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68°С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК⁴

Образцы промывных вод бронхов / бронхоальвеолярной лаважной жидкости (ПВБ / БАЛЖ) и мокроты требуют предварительной подготовки.

Мокрота

Образцы мокроты подлежат обработке с целью снижения вязкости по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение предобработанных образцов мокроты до проведения ИТ:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Промывные воды бронхов / бронхоальвеолярная лаважная жидкость (ПВБ / БАЛЖ)

Образец бронхоальвеолярной лаважной жидкости или промывных вод бронхов перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3-5 с. Отобрать, используя наконечник с фильтром, 1 мл материала и перенести в пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 10 мин при 7000-10 000 g (например, 10 000-12 000 об/мин для лабораторной микроцентрифуги «MiniSpin» («Eppendorf Manufacturing Corporation», Германия)). Используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, удалить супернатант, оставляя над осадком 100-200 мкл надосадочной жидкости, затем тщательно перемешать содержимое на вортексе (например, центрифуге/вортексе Мульти-Спин модель «MSC-3000» (SIA «Biosan», Латвия) или аналогичном) и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3-5 с. Полученный образец использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ИТ:

- при температуре от 2 до 8 °C – до 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минут 16 °C – до года;
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 7).

Были протестированы модельные образцы ПВБ / БАЛЖ и мокроты без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 7. Модельные образцы ПВБ / БАЛЖ и мокроты содержали

стандартный образец предприятия, содержащий ДНК *Aspergillus niger* с концентрацией 5×10^4 ГЭ/мл.

Таблица 7

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мокрота	Эндогенные вещества	Кровь	5%	Не обнаружено
		Муцин	9 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Вориконазол	20 мкг/мл	Не обнаружено
		Изаваконазол	20 мкг/мл	Не обнаружено
		Флуконазол	10 мкг/мл	Не обнаружено
		Гипертонический раствор хлорида натрия	5%	Не обнаружено
ПВБ/БАЛЖ	Эндогенные вещества	Кровь	5%	Не обнаружено
		Муцин	9 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Вориконазол	20 мкг/мл	Не обнаружено
		Изаваконазол	20 мкг/мл	Не обнаружено
		Флуконазол	10 мкг/мл	Не обнаружено
		Гипертонический раствор хлорида натрия	5%	Не обнаружено

ФОРМА IT-50**СОСТАВ**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество пробирок, шт
IT-mix-AN	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,35	1
IT-mix-H	Прозрачная бесцветная жидкость	0,35	1
C+ IT-AN	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1
C–	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2
IC	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1

Программное обеспечение AmpliSens® AN-IT Soft версия 1 и руководство оператора – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыши к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп». Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к данному комплекту для экстракции.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО) – **IC**.

Каждая индивидуальная постановка должна сопровождаться постановкой двух контролей: отрицательного контроля экстракции (**OK**) и положительного контроля экстракции (**ПК**).

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Объем **IC** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (**OK**) внести **100 мкл С-**.

В пробирку положительного контроля экстракции (**ПК**) внести **90 мкл С–** и **10 мкл С+ IT-AN**.

Объем элюции – **50 мкл** (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).

ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для проведения ИТ зависит от используемого амплификатора.

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

А. Подготовка проб для ИТ

Общий объем реакционной смеси – **20 мкл**, включая объем пробы ДНК – **10 мкл**.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 5 мкл IT-mix-AN и 5 мкл IT-mix-H. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 7) плюс запас на 2 реакции.

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

2. Перемешать содержимое пробирки с IT-mix-AN, осадить капли на вортексе. Содержимое пробирки с IT-mix-H перемешать пипетированием, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество IT-mix-AN и IT-mix-H. Тщательно перемешать, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ИТ исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по 10 мкл приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из С+.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из С–.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию в лаборатории необходима постановка отрицательного контроля ИТ (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл С– (без этапа экстракции).

8. Перемешать содержимое пробирок, не допуская появления пены, осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Провести ИТ сразу после соединения реакционной смеси с ДНК-пробами и контролями.

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по углам реакционного модуля амплификатора.
2. Запустить программу амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® AN-IT Soft, согласно руководству оператора;

Примечание – Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS).

 - б) либо в ручном режиме, запрограммировав амплификатор для выполнения программы, указанной в табл. 8.

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Температура, °C	Время	Детекция по каналу для флуорофора	Количество циклов
65	30 с	FAM, JOE	50

Примечания:

1. Не допускается совместная постановка с изотермическими наборами с флуоресцентной детекцией по единственному каналу
2. При одновременном проведении нескольких тестов допускается задать в программе наибольшее количество циклов амплификации из указанных в инструкциях к используемым наборам реагентов. Флуоресцентные сигналы, соответствующие увеличенному количеству циклов, не учитываются при анализе и интерпретации результатов (см. вкладыш к набору реагентов).

ВНИМАНИЕ! В процессе ИТ образуется больше продуктов амплификации, чем в ПЦР, поэтому требуется особая осторожность при утилизации продуктов ИТ.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации в соответствии с табл. 9:

Таблица 9

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК <i>Aspergillus niger</i>	ДНК ВКО

Анализ и интерпретацию результатов проводят вручную с помощью ПО прибора, используемого для амплификации с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® AN-IT Soft. Порядок работы с ПО AmpliSens® AN-IT Soft описан в руководстве оператора.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции, имеющей экспоненциальный подъем, с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t). При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® AN-IT Soft значения C_t определяются автоматически.

Контроль качества исследования

Результат исследования считается валидным, если получены правильные результаты для контролей ИТ в соответствии с табл. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

ПО AmpliSens® RealTime Soft совместно с ПО AmpliSens® AN-IT Soft проводит автоматическую оценку валидности контрольных образцов и исследования в целом. Исследование считается валидным, если отсутствует сообщение об ошибке для ОК, ПК и К—.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов исследования

Контроль	Контролируемый этап исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено меньше граничного</u>	<u>определено или отсутствует</u>
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	<u>определено меньше граничного</u>
К–	ИТ	отсутствует	отсутствует

ВНИМАНИЕ! Настройки приборов и граничные значения указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
отсутствует или больше граничного	<u>определено меньше граничного</u>	ДНК <i>Aspergillus niger</i> НЕ обнаружена
<u>определено меньше граничного</u>	определено или отсутствует	ДНК <i>Aspergillus niger</i> обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный. Требуется повторить исследование

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное. Необходимо повторить исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех

- образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа экстракции ДНК.
- б) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (C_t) отсутствует или больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля амплификации (К–):
- а) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма.
- б) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). При анализе результатов вручную необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии или при анализе результатов в автоматическом режиме, требуется повторно провести амплификацию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. После вскрытия первичной упаковки реагенты должны быть использованы в течение срока годности набора реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Реагенты после вскрытия хранить при той же температуре, что до вскрытия.

Форма IT-50. Хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8°С. IT-mix-AN хранить в защищенном от света месте.

Холодильные 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: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции AmpliSens® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



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



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Температурный диапазон



Дата изготовления

КОПИЯ ВЕРНА

Прочито, пронумеровано и скреплено печатью: 27

двадцать семь

лист 06

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



« 29 » сентября 2024 г.

М.П.

А.О.Лисицына



ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набор реагентов для качественного определения ДНК *Aspergillus niger*
методом изотермической амплификации (ИТ)
AmpliSens® AN-ИТ

Форма IT-50	LOT ДД.ММ.ГГ	ГГГГ-ММ-ДД
		ГГГГ-ММ-ДД

ТУ 20.59.52-458-01897593-2023.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный результат для образца ПК (положительный контроль экстракции)	Определено значение C_t меньше граничного по каналу для флуорофора FAM. Значение C_t по каналу для флуорофора JOE определено или отсутствует	соответствует
Положительный результат для образца ПК, разведенного в 10 раз	Определено значение C_t меньше граничного для исследуемых образцов по каналу для флуорофора FAM. Значение C_t по каналу для флуорофора JOE определено или отсутствует	соответствует
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение C_t отсутствует по каналу для флуорофора FAM. Определено значение C_t меньше граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ИТ)	Значение C_t отсутствует по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
IT-mix-AN	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	IT-50
IT-mix-H	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	IT-50
C+ IT-AN	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	IT-50
C-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	IT-50
IC	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	IT-50

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут в термоконтейнерах, содержащих холодоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Реагенты после вскрытия хранить при той же температуре, что до вскрытия.

Форма IT-50. Хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. IT-mix-AN хранить в защищенном от света месте.

Холодильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

Руководитель ПК



(Коды О.И.)

(Ф.И.О.)



КОПИЯ ВЕРНА

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

«29» октября 2024 г. А.О.Лисицына

**ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
AmpliSens® AN-IT**

Форма IT-60 **REF** H-4581-10

LOT ДД.ММ.ГГ

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 6000/Q

Канал	Calibrate/Gain Optimization.../ Отн.уровня сигнала	Threshold / Порог	Dynamic table/ Динамич.фон	Slope Correct / Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,05	включен	включена	10 %
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,05	включен	включена	10 %

ВНИМАНИЕ! Не допускается совместная постановка с изотермическими наборами с флуоресцентной детекцией по единственному каналу.

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Канал	Threshold / Порог
FAM, HEX	Автоматический порог

DT-66/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Каналы	Критерий положительного результата	Нормализация данных
Сt(Ср)	Пороговый (Сt)	FAM, HEX	70 %	Не использовать

Примечание – Пороговая линия при необходимости может быть установлена вручную на уровне 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образцов ГК в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ГК должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Граничные значения порогового цикла Сt

Дополнительная информация по результатам анализа						
Образец	Приборы роторного типа		Приборы планшетного типа			
	Rotor-Gene 6000/Q		CFX96		DT-66/«ДТпрайм»	
	Канал для флуорофора					
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
С+	35	определено или отсутствует	35	определено или отсутствует	38	определено или отсутствует
Исследуемые образцы	45	45	45	45	45	45
ОК	отсутствует	35	отсутствует	35	отсутствует	38
С-	отсутствует					

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору результатов АмриВеноФ АН-ИТ

Форма IT-00
И-4581-10

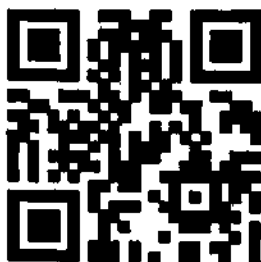


ДД.ММ.ГГ
ГГГГ-ММ-ДД

Информация для загрузки в компьютер, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО АмриВеноФ АН-ИТ Вер. 1.0.1

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
два лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицина

«29» октября 2024 г.
М.П.



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



Краткое руководство

набор реагентов AmpliSens® AN-IT

Форма IT-50: **REF** H-4581-10



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru



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.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции: «РИБО-преп»

Контроли: Внутренний контрольный образец (IC) – в каждом образце.

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

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

IC	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
C–	100 мкл	в пробирку для ОК
C– и C+ IT-AN	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК
Элюция		
Все образцы	50 мкл, допускается увеличение до 100 мкл	в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ИТ

- Общий объем реакционной смеси: 20 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).
Контроли: 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.
- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
 - В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
IT-mix-AN	$5 \cdot (N+K+2)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 2 – запас
IT-mix-H	$5 \cdot (N+K+2)$	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ИТ.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ИТ исследуемых проб и контролей.

Внести по 10 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК и ПК

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию в лаборатории необходима постановка отрицательного контроля ИТ (K-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл C-** (без этапа экстракции).

ВНИМАНИЕ! Провести ИТ сразу после соединения реакционной смеси с ДНК-пробами и контролями.

ПРОВЕДЕНИЕ ИТ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по углам реакционного модуля амплификатора.
- Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® AN-IT Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS);
 - б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

Программа амплификации			
Температура, °C	Время	Детекция по каналу для флуорофора	Кол-во циклов
65	30 с	FAM, JOE	50

Примечания:

1. Не допускается совместная постановка с изотермическими наборами с флуоресцентной детекцией по единственному каналу.
2. При одновременном проведении нескольких тестов допускается задать в программе наибольшее количество циклов амплификации из указанных в инструкциях к используемым наборам реагентов. Флуоресцентные сигналы, соответствующие увеличенному количеству циклов, не учитываются при анализе и интерпретации результатов (см. вкладыш к набору реагентов).

ВНИМАНИЕ! В процессе ИТ образуется больше продуктов амплификации, чем в ПЦР, поэтому требуется особая осторожность при утилизации продуктов ИТ.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводить с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® AN-IT Soft.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК <i>Aspergillus niger</i>	ДНК ВКО

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

КОПИЯ ВЕРНА

Провито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

969

лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

«29» октября 2024 г.

М.П.

А.О.Лисицина

