

Приказом Росздравнадзора
от 12.07.2013 № 3154-Пр/13

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«03» 12 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48
в биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	9
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- Бронхоальвеолярный лаваж
ВКО-FL	- Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
В–	- Отрицательный контроль экстракции
К+	- Положительный контроль ПЦР
К–	- Отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ПКО	- Положительный контрольный образец
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
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
MDR	- Полирезистентность (Multidrug-resistance)
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL»** предназначен для выявления генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных (типы OXA-48 и OXA-162) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путем экстракции из образцов чистой бактериальной культуры, положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого и др.) на плотные или жидкие питательные среды, а также из образцов клинического материала: мочи, мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление фрагментов ДНК генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа:

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/EC.

экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию фрагментов выявляемых генов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации при помощи специфичных праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, 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. Результаты амплификации фрагментов генов карбапенемаз групп KPC и ОХА-48-подобных регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции: для группы KPC – по каналу для флуорофора FAM, для группы ОХА-48-подобных – по каналу для флуорофора JOE. По каналу для флуорофора ROX детектируется продукт амплификации ДНК ВКО (внутреннего контрольного образца).

Канал для флуорофора	FAM ²	JOE ²	ROX ²
ДНК-мишень	Гены карбапенемаз группы KPC	Гены карбапенемаз группы ОХА-48-подобных	ВКО

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

² Или аналогичный канал для детекции указанного флуорофора в зависимости от используемого прибора.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации фрагментов генов карбапенемаз групп КРС и ОХА-48-подобных с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Транспортная среда	Комплект/реагент для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность, копий/мл ³
Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую или плотную ⁴ питательную среду	-	«ГК-экспресс»	5x10 ⁵
		«ДНК-сорб-АМ»	1x10 ⁵
Моча	-	«ДНК-сорб-АМ»	5x10 ²
		«РИБО-преп»	
Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки	«Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	2x10 ³

³ Данная чувствительность достигается при соблюдении правил предварительной обработки образцов биоматериала, изложенных ниже, и рекомендуемом объеме исследуемого образца.

⁴ Для бактериальных культур, полученных путем посева на плотную питательную среду, указана чувствительность в отношении суспензии бактериальных клеток в реагенте «ГК-экспресс» или в лизирующем растворе «ДНК-сорб-АМ», соответственно.

С использованием данного набора реагентов были выявлены гены карбапенемаз соответствующих групп при анализе образцов ДНК контрольных штаммов, несущих гены известных карбапенемаз типов KPC-3 и OXA-48.

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida* spp.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических 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 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 всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует 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 или реактивы, 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 Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы 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 наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду 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.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, США).

Проведение экстракции ДНК из исследуемых образцов

2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ», «РИБО-преп» или «ГК-экспресс» или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов/реагенту для экстракции ДНК.

Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
4. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах (например, Axugen, США).
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.
11. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:

- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Материалом для исследования служат положительная гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого, мочи и др.) на плотные или жидкие питательные среды, чистая бактериальная культура, а также образцы клинического материала: моча (при острых инфекциях мочевыводящих путей), мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки (при проведении скрининга колонизации бактериями, обладающими приобретенными карбапенемазами).

Мазки со слизистых оболочек ротоглотки или прямой кишки должны быть помещены в транспортную среду «Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

**Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная
путем первичного посева клинического материала на
жидкую питательную среду**

Перенести от 0,1 до 0,25 мл гемокультуры или посева на среду обогащения в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл (с помощью одноразового шприца).

Центрифугировать 10 мин при 10000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

Моча

Взболтать флакон с мочой. Перенести 1 мл мочи в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл, используя отдельный наконечник с фильтром для каждого образца. Центрифугировать 10 мин при 10000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова центрифугировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

С полученными после предварительной обработки образцами (осадками) провести процедуру экстракции ДНК в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Полученные после предварительной обработки образцы (осадки) можно хранить:

- при температуре не выше минус 16 °C – в течение недели,
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов генов карбапенемаз групп КРС и ОХА-48-подобных с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT КРС/ОХА-48	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО-1 КРС/ОХА-48	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО-2 КРС/ОХА-48	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Таблица 1

Схема проведения ПЦР-исследования в зависимости от вида биологического материала

Вид биологического материала	Объем для экстракции, мкл	Комплект/реагент для экстракции ДНК	Добавление ВКО-FL при экстракции	Программа амплификации	Используемый положительный контроль амплификации
Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую питательную среду	Осадок из 100-250 мкл, полученный после предобработки	«ГК-экспресс»	–	«АмплиСенс-В»	ПКО-1 KPC/OXA-48
		«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 KPC/OXA-48
Смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на плотную питательную среду	10 ⁷ -10 ⁹ бактериальных клеток	«ГК-экспресс»	–	«АмплиСенс-В»	ПКО-1 KPC/OXA-48
		«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 KPC/OXA-48
Моча	Осадок из 1000 мкл, полученный после предобработки	«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 KPC/OXA-48
		«РИБО-преп»			
Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки	100	«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 KPC/OXA-48

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов / реагент:

- «ГК-экспресс» или «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной при посеве на жидкую питательную среду**, после предварительной

обработки, образцов **чистой культуры или смеси бактериальных культур**, полученной при посеве на **плотную питательную среду** в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов/реагенту.

- «ДНК-сорб-АМ» или «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов **мочи** после предварительной обработки в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.
- «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки** в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве пробы В– используется реактив ОКО. В случае использования для экстракции ДНК реагента «ГК-экспресс» добавления ВКО-FL в исследуемые образцы и ОКО в пробу В– не требуется.

При проведении экстракции ДНК из образцов, после предобработки представляющих собой осадки, лизирующий раствор или реагент «ГК-экспресс» добавляют непосредственно в пробирку с осадком, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

При проведении экстракции из образцов чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной при посеве на плотную питательную среду, бактериальные клетки, взятые стерильной петлей (или стерильным наконечником) в количестве 10^7 - 10^9 клеток, помещают непосредственно в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую реагент «ГК-экспресс» или лизирующий раствор набора «ДНК-сорб-АМ».

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется одновременно проводить экстракцию ДНК из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, и из образцов биологического материала других видов, т.к. при этом существует высокий риск контаминации от образцов положительной гемокультуры или бактериальных культур, содержащих высокие концентрации ДНК возбудителя.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 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 пробирок для амплификации

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

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT КРС/ОХА-48,**
- **5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT,**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (30 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл)** и аккуратно перемешать на центрифуге/вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 60 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Перемешать содержимое пробирки с реагентом **ПЦР-смесь-1-FRT КРС/ОХА-48** и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1.**

Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **3-х контрольных реакций: К+, К– и В–**.

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FRT КРС/ОХА-48**, **ПЦР-смеси-2-FRT** с **полимеразой (TaqF)**, приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл К–**.
 - в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в одну пробирку внести **10 мкл ПКО-1 КРС/ОХА-48** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-В») или **10 мкл ПКО-2 КРС/ОХА-48** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала или из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-1»).

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала. При анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью реагента «ГК-экспресс» из образцов гемокультуры, чистой культуры или

смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, используется программа **«АмплиСенс-В»** (см. табл. 2). При анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала, или проб ДНК, полученных при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, используется программа **«АмплиСенс-1»** (см. табл. 3).

Таблица 2

Программа «АмплиСенс-В»

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во 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	

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по трем

⁵ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶ Например, CFX, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

каналам – для флуорофоров FAM⁷, JOE⁷ и ROX⁷.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов карбапенемаз группы KPC**;
- по каналу для флуорофора **JOE** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов карбапенемаз группы OXA-48-подобных**;
- по каналу для флуорофора **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК внутреннего контроля**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **Гены карбапенемаз** соответствующей группы **обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM или/и JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать

⁷ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **Гены карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров FAM и JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для исследуемого образца отсутствуют значения пороговых циклов C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE, и по каналу для флуорофора ROX значение C_t также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей 4 и вкладышем к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла C_t	
		по каналам для флуорофоров FAM, JOE	по каналу для флуорофора ROX
B–	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
K–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Не оценивается

Результат ПЦР-исследования считается недостоверным в следующих случаях:

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) значения порогового цикла по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствуют или превышают указанное граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (B-) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) регистрируется значение порогового цикла C_t по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE.

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

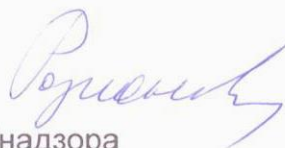
Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT КРС/ОХА-48 хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс® MDR КРС/ОХА-48-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁸.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор НИИ антимикробной химиотерапии
ГБОУ ВПО СГМА Минздрава РФ



Р.С. Козлов

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Схема приготовления реакционных смесей

	Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл)	
Объем реагентов на одну реакцию (мкл)	10 мкл	5 мкл
Количество исследуемых образцов*	ПЦР-смесь-1-FRT *	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)*
2	60	30
3	70	35
4	80	40
5	90	45
6	100	50
7	110	55
8	120	60
9	130	65
10	140	70
11	150	75
12	160	80
13	170	85
14	180	90
15	190	95
16	200	100
17	210	105
18	220	110
19	230	115
20	240	120
21	250	125
22	260	130
23	270	135
24	280	140
25	290	145

*Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки 3 контрольных реакций: К+, В– и К–.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное
число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro
диагностики



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Дата изменения



Не допускать
попадания
солнечного света



Ограничение
температуры



Дата
изготовления



Производитель

Приказом Росздравнадзора
от 04.08.13г. № 2291-17п/13

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«04» 12 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления генов металло- β -лактамаз групп VIM, IMP
и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® MDR MBL-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	9
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- Бронхоальвеолярный лаваж
ВКО-FL	- Внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
В–	- Отрицательный контроль экстракции
К+	- Положительный контроль ПЦР
К–	- Отрицательный контроль ПЦР
МБЛ, MBL	- Металло-β-лактамазы
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ПКО	- Положительный контрольный образец
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
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
MDR	- Полирезистентность (Multidrug-resistance)
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» предназначен для выявления генов приобретенных карбапенемаз класса металло-β-лактамаз (МБЛ) групп VIM, IMP и NDM методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путем экстракции из образцов чистой бактериальной культуры, положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого и др.) на плотные или жидкие питательные среды, а также из образцов клинического материала: мочи, мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление фрагментов ДНК генов приобретенных металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/EC.

включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала и амплификацию фрагментов выявляемых генов МБЛ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации при помощи специфичных праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, 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. Результаты амплификации фрагментов генов МБЛ групп VIM, IMP и NDM регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции: для группы VIM – по каналу для флуорофора FAM, для группы IMP – по каналу для флуорофора JOE, для группы NDM – по каналу для флуорофора Cy5. По каналу для флуорофора ROX детектируется продукт амплификации ДНК ВКО (внутреннего контрольного образца).

Канал для флуорофора	FAM ²	JOE ²	ROX ²	Cy5 ²
ДНК-мишень	гены МБЛ группы VIM	гены МБЛ группы IMP	ВКО	гены МБЛ группы NDM

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

² Или аналогичный канал для детекции указанного флуорофора в зависимости от используемого прибора.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации фрагментов генов МБЛ групп VIM, IMP и NDM с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Транспортная среда	Комплект/реагент для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность, копий/мл ³
Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую или плотную ⁴ питательную среду,	—	«ГК-экспресс»	5x10 ⁵
		«ДНК-сорб-АМ»	1x10 ⁵
Моча	—	«ДНК-сорб-АМ»	5x10 ²
		«РИБО-преп»	
Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки	«Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	2x10 ³

С использованием данного набора реагентов были выявлены гены MBL соответствующих групп при анализе образцов ДНК контрольных штаммов, несущих гены известных MBL

³ Данная чувствительность достигается при соблюдении правил предварительной обработки образцов биоматериала, изложенных ниже, и рекомендуемом исследуемом объеме образца.

⁴ Для бактериальных культур, полученных путем посева на плотную питательную среду, указана чувствительность в отношении суспензии бактериальных клеток в реагенте «ГК-экспресс» или в лизирующем растворе «ДНК-сорб-АМ» соответственно.

следующих групп: VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-10, IMP-1, IMP-2, IMP-12, IMP-13.

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida* spp.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических 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 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 всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует 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 или реактивы, 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 Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена

предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы 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 наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду 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.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл

(например, Ахуген, США).

Проведение экстракции ДНК из исследуемых образцов

2. Комплект реагентов/реагент для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (форма комплектации без контролей), «РИБО-преп», «ГК-экспресс» или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов/реагенту для экстракции ДНК.

Проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
5. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой –

- при использовании прибора планшетного типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Материалом для исследования служат: положительная гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого, мочи и др.) на плотные или жидкие питательные среды, чистая бактериальная культура, а также образцы клинического материала: моча (при острых инфекциях мочевыводящих путей), мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки (при проведении скрининга колонизации бактериями, обладающими приобретенными карбапенемазами).

Мазки со слизистых оболочек ротоглотки или прямой кишки должны быть помещены в транспортную среду «Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала на жидкую питательную среду

Перенести от 0,1 до 0,25 мл гемокультуры или посева на среду обогащения в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл (с помощью одноразового шприца).

Центрифугировать 10 мин при 10 000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). Используя вакуумный

отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

Моча

Взболтать флакон с мочой. Перенести 1 мл мочи в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл, используя отдельный наконечник с фильтром для каждого образца. Центрифугировать 10 мин при 10 000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова центрифугировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

С полученными после предварительной обработки образцами (осадками) провести процедуру экстракции ДНК в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Полученные после предварительной обработки образцы (осадки) можно хранить:

- при температуре не выше минус 16 °С – в течение недели,
- при температуре не выше минус 68 °С - длительно.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT MBL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО-1 MBL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО-2 MBL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс®»

MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Таблица 1

Схема проведения ПЦР-исследования в зависимости от вида биологического материала

Вид биологического материала	Объем для экстракции, мкл	Комплект/реагент для экстракции ДНК	Добавление ВКО-FL при экстракции	Программа амплификации	Используемый положительный контроль амплификации
Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую питательную среду	Осадок из 100-250 мкл, полученный после предобработки	«ГК-экспресс»	–	«АмплиСенс-В»	ПКО-1 MBL
		«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 MBL
Смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на плотную питательную среду	10 ⁷ -10 ⁹ бактериальных клеток	«ГК-экспресс»	–	«АмплиСенс-В»	ПКО-1 MBL
		«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 MBL
Моча	Осадок из 1000 мкл, полученный после предобработки	«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 MBL
		«РИБО-преп»			
Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки	100	«ДНК-сорб-АМ»	+	«АмплиСенс-1»	ПКО-2 MBL

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов / реагент:

- «ГК-экспресс» или «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной при посеве на жидкую питательную среду (после предварительной обработки), образцов чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной при посеве на**

плотную питательную среду, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

- «ДНК-сорб-АМ» или «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов **мочи** после предварительной обработки, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.
- «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки** в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве пробы В- используется реактив ОКО. В случае использования для экстракции ДНК реагента «ГК-экспресс» добавление ВКО-FL в исследуемые образцы и ОКО в пробу В- не требуется.

При проведении экстракции ДНК из образцов, после предобработки представляющих собой осадки, лизирующий раствор или реагент «ГК-экспресс» добавляют непосредственно в пробирку с осадком, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

При проведении экстракции из образцов чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной при посеве на плотную питательную среду, бактериальные клетки, взятые стерильной петлей (или стерильным наконечником) в количестве 10^7 - 10^9 клеток, помещают непосредственно в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую реагент «ГК-экспресс» или лизирующий раствор набора «ДНК-сорб-АМ».

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется одновременно проводить экстракцию ДНК из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, и из образцов биологического материала других видов, т.к. при этом существует высокий риск контаминации от образцов положительной гемокультуры или бактериальных культур, содержащих высокие концентрации ДНК возбудителя.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 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 пробирок для амплификации

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

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT MBL,**
- **5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT,**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**

1. Предварительно необходимо подготовить смесь **ПЦР-смеси-2-FRT** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (30 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл)** и аккуратно перемешать на центрифуге/вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 60 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Перемешать содержимое пробирки с реагентом **ПЦР-смесь-1-FRT MBL** и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1.**

Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **3-х контрольных реакций: К+, К– и В–**.

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FRT MBL**, **ПЦР-смеси-2-FRT** с **полимеразой (TaqF)**, приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл К–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в одну пробирку внести **10 мкл ПКО-1 MBL** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-В») или **10 мкл ПКО-2 MBL** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала или из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-1»).
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала. При анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью реагента «ГК-экспресс» из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на

питательную среду, используется программа «АмплиСенс-В» (см. табл. 2). При анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала, или проб ДНК, полученных при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, используется программа «АмплиСенс-1» (см. табл. 3).

Таблица 2

Программа «АмплиСенс-В»

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во 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	

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по четырем каналам – для флуорофоров FAM⁷, JOE⁷, ROX⁷ и Cy5⁷.

⁵ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶ Например, CFX, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁷ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов МБЛ группы VIM**;
- по каналу для флуорофора **JOE** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов МБЛ группы IMP**;
- по каналу для флуорофора **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК внутреннего контроля**;
- по каналу для флуорофора **Sy5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов МБЛ группы NDM**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **Гены МБЛ** соответствующей группы **обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM или/и JOE, или/и Sy5 определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанного граничного значения. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на

участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **Гены МБЛ** соответствующей группы **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров FAM, JOE и Cy5 не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для исследуемого образца отсутствуют значения пороговых циклов C_t по каналам для флуорофоров FAM, JOE и Cy5, и по каналу для флуорофора ROX значение C_t также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей 4 и вкладышем к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла C_t	
		по каналам для флуорофоров FAM, JOE, Cy5	по каналу для флуорофора ROX
В–	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Не оценивается

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значения порогового цикла по каналам для флуорофоров FAM, JOE, Cy5 отсутствуют или превышают указанное граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) регистрируется значение порогового цикла C_t по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, или/и Cy5, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, или/и Cy5.

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

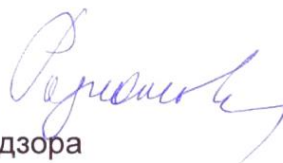
Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT MBL хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.


Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁸.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор НИИАХ ГБОУ ВПО СГМА
Минздрава России



Р.С. Козлов

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Схема приготовления реакционных смесей

	Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл)	
Объем реагентов на одну реакцию (мкл)	10 мкл	5 мкл
Количество исследуемых образцов*	ПЦР-смесь-1-FRT *	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)*
2	60	30
3	70	35
4	80	40
5	90	45
6	100	50
7	110	55
8	120	60
9	130	65
10	140	70
11	150	75
12	160	80
13	170	85
14	180	90
15	190	95
16	200	100
17	210	105
18	220	110
19	230	115
20	240	120
21	250	125
22	260	130
23	270	135
24	280	140
25	290	145

*Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки 3 контрольных реакций: К+, В– и К–.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное
число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro
диагностики



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Дата изменения



Не допускать
попадания
солнечного света



Ограничение
температуры



Дата
изготовления



Производитель



Management Systems Certification Body
Institut pro testování a certifikaci, a.s.
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic
www.itczlin.cz

CERTIFICATE

No. 18 0028 SJ

We confirm on the basis of a performed audit that company

**Federal Budget Institute of Science “Central
Research Institute for Epidemiology”**

3a, Novogireevskaya str., 111123 Moscow, Russian Federation

has implemented and documented a functional quality management system
in compliance with the requirements of the standard

EN ISO 13485:2016

Covering the following activities:

Design and development, manufacturing and final control of *in vitro* diagnostic
medical devices

The Certificate is issued on the basis of the results mentioned in Audit Report No. 233404641/2018.
The Certificate validity is conditioned by positive results of surveillance audits, which the certified
company committed to undergo.

During use of the Certificate the Certificate Holder undertakes to follow the Rules of Use of the Certificate. This
document is publicly available on www.itczlin.cz



Date of Issue: 07. 05. 2018

Valid until: 07. 05. 2021

Date of the first certification awarding: 20. 05. 2015

Ing. Pavel Vaněk
Head of Certification Body



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

EC Certificate - Full Quality Assurance System No. 11 0040 QS/NB

The quality system of manufacturer

Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”

3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

has been certified as meeting the requirements of

Directive 98/79/EC

on in vitro diagnostic medical devices, Annex IV excluding (4, 6)

for the following product category(ies):

AmpliSens® PCR kits

The Notified Body No. 1023 declares that the aforementioned manufacturer has implemented a quality assurance system for design, manufacture and final inspection of the respective devices / device categories in accordance with IVDD Annex IV. This quality assurance system conforms to the requirements of this Directive and is subjected to periodical surveillance. For placing on the market of List A devices covered by this certificate, an EC Design-Examination Certificate according to Annex IV (Section 4) is required.

Valid from: 2018-10-31
Valid until: 2021-06-16
First Issued: 2011-01-24
Revision: h



Date: 2018-10-31

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute
for Epidemiology"**
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Product(s):

Name: **AmpliSens® Rubella virus-FRT PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT-50 F

Classification: List B

GMDN: 30793

Name: **AmpliSens® Toxoplasma gondii-FRT PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT-50 F

Classification: List B

GMDN: 52428

Name: **AmpliSens® CMV-FEP PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5-ml tubes), variant FEP (0.2-ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 30798

Name: **AmpliSens® CMV-FRT PCR kit**

Trade name(s): -

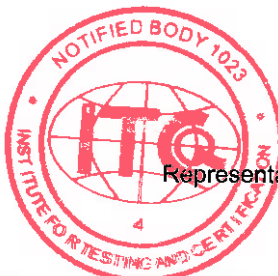
Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 30798

Date: 2018-10-31

Revision: h



Mgr. Jiří Heš

Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute
for Epidemiology"**
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Name: **AmpliSens® HSV / CMV-MULTIPRIME-FEP
PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5-ml tubes), variant FEP (0.2-ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 61348

Name: **AmpliSens® HSV / CMV-MULTIPRIME-FRT
PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 61348

Name: **AmpliSens® CMV-screen/monitor-FRT PCR
kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 30798



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute
for Epidemiology”**
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Name: **AmpliSens® EBV / CMV / HHV6-screen-FRT
PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 61348

Name: **AmpliSens® Chlamydia trachomatis-FEP
PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5-ml tubes), variant FEP (0.2-ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 30677

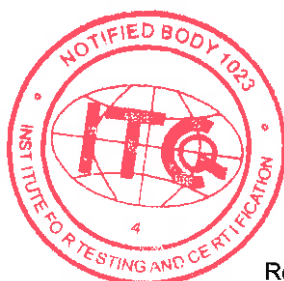
Name: **AmpliSens® Chlamydia trachomatis-FRT
PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 30677



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute
for Epidemiology"**

3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Name: **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma-
MULTIPRIME-FEP PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 50409

Name: **AmpliSens® C.trachomatis / M.genitalium
MULTIPRIME-FEP PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 50409

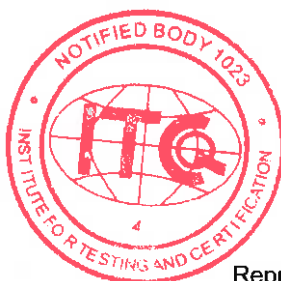
Name: **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma /
M.genitalium-MULTIPRIME-FEP PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 50409



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute
for Epidemiology”**
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Name: **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma / M.genitalium-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 50409

Name: **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma / M.hominis-MULTIPRIME-FEP PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 50409

Name: **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma / M.hominis-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 50409



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute
for Epidemiology"**

3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Name: AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma /
M.genitalium / M.hominis-MULTIPRIME-FRT
PCR kit

Trade name(s):

-

Model(s):

variant FRT, variant FRT-100 F

Classification:

List B

GMDN:

50409

Name: AmpliSens® N.gonorrhoeae / C.trachomatis /
M.genitalium / T.vaginalis-MULTIPRIME-FRT
PCR kit

Trade name(s):

-

Model(s):

variant FRT, variant FRT-100 F

Classification:

List B

GMDN:

50409

Name: AmpliSens® N.gonorrhoeae / C.trachomatis /
M.genitalium-MULTIPRIME-FEP PCR kit

Trade name(s):

-

Model(s):

variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

Classification:

List B

GMDN:

50409

Date: 2018-10-31

Revision: h



Mgr. Jiří Heš

Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute
for Epidemiology"**
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Name: **AmpliSens® N.gonorrhoeae / C.trachomatis /
M.genitalium-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

Trade name(s):

Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 50409

Name: **AmpliSens® Genoscreen HLA B*5701-FRT
PCR kit**

Trade name(s):

Model(s): variant FRT

Classification: List B

GMDN: 56403

Name: **AmpliSens® Mycoplasma pneumoniae /
Chlamydomydia pneumoniae-FEP PCR kit**

Trade name(s):

Model(s): variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 58957



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute
for Epidemiology"**

3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Name: **AmpliSens® Mycoplasma pneumoniae /
Chlamydomonas pneumoniae-FRT PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 58957

Name: **AmpliSens® T.vaginalis / N.gonorrhoeae /
C.trachomatis-MULTIPRIME-FEP PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

Classification: List B

GMDN: 61144

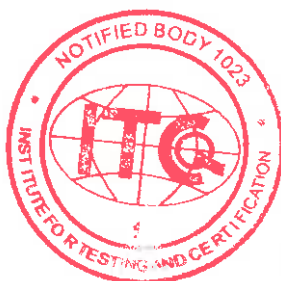
Name: **AmpliSens® T.vaginalis / N.gonorrhoeae /
C.trachomatis-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

Trade name(s): -

Model(s): variant FRT, variant FRT-100 F

Classification: List B

GMDN: 61144



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

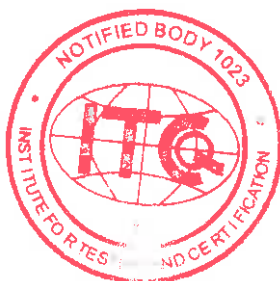
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute
for Epidemiology”**

3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Facility(ies):

Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

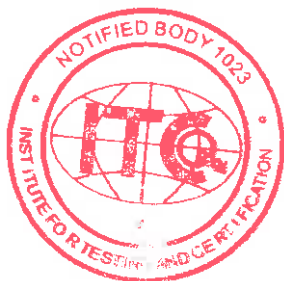
Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute
for Epidemiology"**
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Certificate History:

Revision	Date	Reference Number	Action
	2011-01-24	813600111	Certification
a	2011-07-21	813600161	Change of manufacturer name
b	2012-02-13	343601304	Product scope extension
c	2014-05-13	343602568	Product scope extension
d	2016-01-15	813600504a	Prolongation of certificate validity
e	2016-06-17	813600504	Re-certification process
f	2016-08-29	343603690	Change of manufacturer facility address
g	2017-11-30	343603888	Changes of product compositions, packaging and quality system documentation
h	2018-10-31	813600754	Change of product labelling, shelf life extension and quality system documentation



Date: 2018-10-31
Revision: h

Mgr. Jiří Heš
Representative of the Notified Body No. 1023