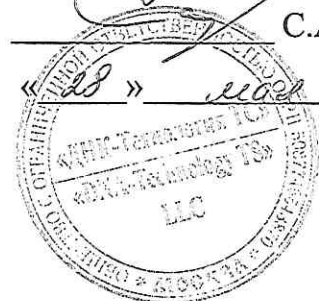


Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»


С.А. Самарин
«28» _____ 2020 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»


С.П. Левичев
«28» _____ 2020 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

**Набора реагентов для выявления генов резистентности
к гликопептидным и бета-лактамным антибиотикам у бактерий
методом ПЦР в режиме реального времени
(БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес)**

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ ТС»
САМАРИН С.А.
ПОДПИСЬ



2020 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

АБП	- антибактериальные препараты
БЛРС	- бета-лактамазы расширенного спектра
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОБМ	- общая бактериальная масса
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
MRSA	- Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
MRS	- Methicillin Resistant Staphylococcus
VRSA	- Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus
VRE	- Vancomycin Resistant Enterococcus
ИБ	- интерферирующие вещества
НК	- нуклеиновые кислоты
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец
ДИ	- доверительный интервал

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в России, как и во всем мире, отмечается стремительное распространение устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к АБП[1]. Развитие лекарственной резистентности приводит к появлению способности микроорганизмов сохранять свою жизнедеятельность, несмотря на применение этиотропной терапии.

Существуют несколько основных механизмов собственной устойчивости бактерий к антибиотикам: ферментативная инактивация, уменьшение проницаемости внешних структур микробной клетки, модификация внутриклеточной мишени, активное выведение лекарства, активация метаболического шунта.

Резистентность микроорганизмов может быть природной и приобретённой, но формирование её во всех случаях обусловлено генетически [2]. Появление и распространение приобретенной резистентности составляет основную клиническую проблему, поскольку ее наличие у конкретной бактерии – возбудителя инфекционной болезни - невозможно прогнозировать [3]. Гены, ассоциированные с этой способностью, зачастую локализованы на мобильных генетических элементах, что способствует их быстрому распространению между бактериями [4]. Интенсификации этого процесса способствуют избыточное и необоснованное назначение антибактериальных препаратов; самолечение, сопровождающееся недостаточностью знаний об этиологии инфекционного процесса, спектре действия антибиотиков; использование АБП для лечения и стимуляции роста животных и птиц в сельском хозяйстве.

В последнее время активно появляются сообщения об устойчивости некоторых штаммов бактерий более чем к трем классам АБП (так называемая мультирезистентность или полирезистентность); ко всем АБП, кроме одного-двух классов (экстремальная резистентность); ко всем АБП (панрезистентность) [5].

Бактерии, не чувствительные к лекарственным препаратам, встречаются среди возбудителей как негоспитальных, так и нозокомиальных, т.е. развившихся в стационаре, инфекций. Инфекционные заболевания, вызванные штаммами, устойчивыми к антибиотикам, отличаются длительным течением, часто ухудшают прогноз для пациентов, требуют госпитализации с продолжительным пребыванием в стационаре [6]. При неэффективности стартовой антибактериальной терапии клиницисты вынуждены использовать альтернативные препараты, что приводит к увеличению экономических затрат. Таким образом, устойчивость к антибиотикам является одной из основных проблем современного здравоохранения во всем мире [7].

Научное обоснование

Бета-лактамы относятся к активно применяемым препаратам. По химическому строению они разделяются на несколько групп: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы, общим компонентом которых является наличие бета-лактамного кольца [8]. Бактериальные ферменты, способные расщеплять эти антибиотики и содержащие в своей структуре циклическую амидную связь, носят названия бета-лактамаз. К настоящему времени описано более 850 различных бета-лактамаз и их количество растет с каждым годом. На основе их важнейших свойств: субстратная специфичность к пенициллинам, цефалоспорином, монобактамам, карбапенемам; хромосомная или плазмидная локализация; чувствительность к ингибиторам созданы различные системы классификации ферментов [9].

По механизму действия все бета-лактамазы делятся на сериновые (классы А, С, D) и металло-бета-лактамазы (класс В). Лактамазы класса С в данном наборе не исследуются.

Деление	Бета-лактамазы			
по механизму действия	сериновые			металло-лактамазы
молекулярный класс	С	А	Д	В
функциональная группа	1	2	2	3
подгруппы	1	2а, 2b, 2с, 2d, 2е, 2f и др.	2d	3а, 3b, 3с
группы	CMY, AmpC, AСТ и др.	TEM, SHV, GES, KPC, CTX-M и др.	OXA-23-like*, OXA-40-like, OXA-48-like, OXA-51-like и др.	IMP, VIM, NDM и др.
встречаются	грам(-)** бактерии	грам(-) и грам(+)*** бактерии	грам(-) бактерии	грам(-) бактерии
*like – подобные. **грам(-)бактерии – грамотрицательные бактерии. ***грам(+)бактерии – грамположительные бактерии.				

К бета-лактамазам широкого спектра относятся ферменты А2 (TEM, SHV), вырабатываемые представителями семейства Enterobacteriaceae и способные инактивировать пенициллины и цефалоспорины I-II поколения [10].

Бета-лактамазы класса А2 расширенного спектра действия (БЛРС или ESBL) обеспечивают резистентность почти ко всем пенициллинам и цефалоспорином I-IV поколения, а также часто обладают ассоциированной резистентностью к антибиотикам других классов. К этим ферментам относятся TEM, SHV, CTX.

Встречаются ферменты, способные инактивировать карбапенемы и другие бета-лактамы антибиотики. Эти карбапенемазы относятся к сериновым бета-лактамазам: молекулярный класс А (GES, KPC) и D (группы OXA-23-LIKE, OXA-40-LIKE, OXA-48-LIKE, OXA-51-LIKE и др.) или к металло-бета-лактамазам: класс В (IMP, VIM).

Бета-лактамазы-оха, имеющие незначительные отличия в строении, объединяются в группы ферментов. Например, OXA-23-LIKE – это группа ферментов, состоящая из 19 ферментов, подобных OXA-23 [11].

Грамположительные микроорганизмы, устойчивые к АБП, также остаются этиологически значимыми, например, представители рода *Staphylococcus*. Наиболее патогенным среди них является вид *S. aureus*. Наличие метициллин-резистентности характеризует штаммы как MRS и MRSA.

Препаратами выбора при инфекциях, вызванных MRSA\MRS, энтерококками и другими грамположительными бактериями в настоящее время являются гликопептиды.

Известны несколько типов ванкомицин-резистентности (VanA, VanB и др.). Важную клиническую значимость имеют VRSA и VRE.

Таким образом, устойчивость к АБП характеризуется высокой скоростью распространения, различается по группам бактерий, по группам лекарственных препаратов и варьируется по географическим областям.

Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам, разработанный Всемирной Организацией Здравоохранения, отражает серьёзность проблемы: резистентность к противомикробным препаратам представляет собой значительную угрозу для здоровья человека. Одной из его стратегических задач определено накопление знаний за счёт исследований и эпиднадзора [12].

Существуют фенотипические (традиционные, микробиологические) и молекулярно-генетические методы выявления резистентности к АБП. Федеральные клинические рекомендации не рекомендуют использование традиционной диагностики в качестве единственного метода при эпидемиологических исследованиях, например, внутрибольничной инфекции [10], и определяют молекулярно-генетические исследования в качестве метода выбора при:

- исследовании вспышек острых и хронических инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи;
- верификации результатов фенотипических методов внутривидового типирования (антибиотикорезистентности), направленного на выявление госпитальных штаммов;
- при слежении за циркуляцией международных эпидемических клонов в пределах территориальных единиц, субъектов РФ и на национальном уровне.

Молекулярно-генетические методы позволяют выявлять гены, ассоциированные с резистентностью к АБП. Преимуществами такого подхода являются: высокая чувствительность, скорость получения результатов, стандартизованность и технологичность исследования. Важно, что при проведении исследования не требуются манипуляции с живыми бактериальными культурами, а это, в свою очередь, служит предотвращению распространения и циркуляции микроорганизмов внутри лечебно-диагностических и лабораторных учреждений.

Результаты исследования с набором реагентов для выявления генов резистентности к гликопептидным и бета - лактамным антибиотикам у бактерий методом ПЦР в режиме реального времени (БакРези-ста GLA, БакРезиста GLA Van/Mec) персонализированы, дают развернутую картину этиологии резистентности к гликопептидным и бета-лактмамным антибиотикам, позволяют сократить сроки для выбора оптимальной антибактериальной терапии и снизить экономические затраты на лечение.

Список литературы

1. Фурсова Н. К., Лекарственная устойчивость микроорганизмов, Учебное пособие. – Пушино: ОнтоПринт, 2012. - 247 с.
2. Землянко О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – № 3. – С. 4–17.
3. Сидоренко С. В., Тишков В. И., Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263-306.
4. Супотницкий М. В., Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 4–11.
5. Эйдельштейн М. В., Экстремально- и панрезистентные клоны бактериальных возбудителей в клинике. «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (ИСМП-2015) 23-25 ноября 2015 г.
6. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. – М.: НИИАХ СГМА, 2002. – 381 с.
7. Козлов Р. С., Устойчивость к антибиотикам как одна из основных проблем современного здравоохранения // Вестник Росздравнадзора. – 2017. – № 4. – С. 28-33.

8. Рубцова М. Ю., Уляшова М. М., Бахман Т. Т., Шмид Р. Д., Егоров А. М., Мультипараметрическое определение генов и точечных мутаций в них для идентификации бета-лактамаз / // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 303-348.
9. Эйдельштейн М. В., Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – № 3. – С. – 223–42.
10. Кафтырева Л. А., Зуева Л. П., Колосовская Е. Н. , Егорова С. А. , Макарова М. А. , Светличная Ю. С. , Кузин А. А. , Свистунов С. А., Принципы организации мониторингования устойчивости ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к антимикробным препаратам в лечебно-профилактических медицинских организациях здравоохранения: федер. клин. рекомендации , – М., 2014. – 37 с.
11. Evans B.A., Amyes S.G., OXA – Lactamases // Clinical Microbiology Reviews. – 2014. – Vol. 27 (2). – P. 241–263.
12. Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. Всемирная организация здравоохранения.– 2016.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления генов резистентности к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам у бактерий методом ПЦР в режиме реального времени (БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Набор реагентов предназначен для выявления генов резистентности к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам в препаратах ДНК, полученных из биологического материала человека и бактериальных культур из этого биоматериала (мокрота, моча, мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, аспираты, экссудаты) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием детектирующих амплификаторов.

1.3 Функциональное назначение: вспомогательное средство для диагностики *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: необходимость исследования возможной антибиотикорезистентности у бактерий, вызвавших развитие инфекционных процессов.

1.5 Набор реагентов может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

1.6 Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.

1.7 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов (БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес) выпускается в следующих вариантах исполнения:

- БакРезиста GLA;
- БакРезиста GLA Van/Мес.

Набор реагентов в исполнении БакРезиста GLA используется для выявления генов резистентности к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам: van A\B (ванкомицину, тейкопланину); mec A (метициллину, оксациллину); tem, ctx-M-1, shv (пенициллинам и цефалоспорином); oxa-40-like, oxa-48-like, oxa-23-like, oxa-51-like, imp, kpc, ges, ndm, vim (карбапенемам).

Набор реагентов в исполнении БакРезиста GLA Van/Мес является сокращенным вариантом БакРезиста GLA и используется для выявления генов резистентности к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам: van A\B (ванкомицину, тейкопланину); mec A (метициллину, оксациллину).

2.1 Состав набора

2.1.1 БакРезиста GLA

REF R1-P026-S3/5, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под белым воскообразным слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	320 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

2.1.2 БакРезиста GLA Van/Мес

REF R1-P027-S3/4, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под белым воскообразным слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл
Крышки для стрипов	6 шт.		

REF R1-P027-23/4, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под белым воскообразным слоем	48 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов в исполнении БакРезиста GLA предназначен для одноразового применения и рассчитан на проведение 24 определений, что соответствует исследованию не более 20 неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

Набор реагентов в исполнении БакРезиста GLA Van/Мес предназначен для одноразового применения и рассчитан на проведение 48 определений, что соответствует исследованию не более 46 неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный и полуколичественный мультиплексный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором. Количество разрушенных зондов увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

Набор реагентов в варианте исполнения БакРезиста GLA включает смеси для амплификации, специфичные для определения генов, ассоциированных с резистентностью (van A, van B, mec A, imp, oxa-51-like, tem, ctx-M-1, oxa-40-like, oxa-48-like, kpc, ges, ndm, oxa-23-like, shv, vim), и для ДНК всех бактерий (ОБМ).

Набор реагентов в варианте исполнения БакРезиста GLA Van/Мес включает смесь для амплификации, специфичную для определения генов резистентности (van A, van B, mec A).

В состав смесей для амплификации (кроме пробирки №3 для варианта исполнения БакРезиста GLA) включен внутренний контроль, предназначенный для оценки качества полимеразной цепной реакции в каждой отдельной пробирке. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации генов, ассоциированных с резистентностью, включены флуоресцентные метки Fam и Cy5. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Нех.

В смесь для амплификации пробирки № 8 набора в варианте исполнения БакРезиста GLA добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором для определения положения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора. После окончания программы программное обеспечение проводит сравнение заданного оператором расположения стрипов с реальным положением маркера Rox, и, если находит несовпадение (при неправильном расположении стрипов), то предупреждает об этом оператора.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке, одновременно.

Варианты исполнения набора реагентов (БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес), выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 – Варианты исполнения набора реагентов (БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес), выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки в стрипе	Каналы детекции					Цветовая маркировка смеси
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5	
БакРезиста GLA						
1	imp	БК**	-	-	-	Голубая
2	ОБМ*	БК	-	oxa-51-like	-	Бесцветная
3	ctx-M-1	-	-	tem	-	
4	van A\B	БК	-	mec A	-	
5	oxa-48-like	БК	-	oxa-40-like	-	
6	vim	БК	-	kpc	-	
7	oxa-23-like	БК	-	ndm	-	
8	shv	БК	Маркер	ges	-	
БакРезиста GLA Van/Мес						
-	van A\B	БК	-	mec A	-	Бесцветная
*ОБМ - общая бактериальная масса, **БК – внутренний контроль						

Исследование с использованием набора реагентов БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 1,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

В образцах исследуемого материала, содержащего ДНК бактерий, резистентных к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты амплификации специфических продуктов по заявленным каналам детекции.

В образцах исследуемого материала, не содержащего ДНК резистентных бактерий, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательные результаты амплификации специфических продуктов по заявленным каналам детекции.

Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций для каждой специфической системы, входящей в состав набора, к анализам, выявляемым другими специфическими системами набора.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. раздел 2.3, раздел 9.3).

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, по результатам анализа рисков и проведения НИОКР отнесены следующие вещества: гемоглобин, присутствующий в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из образца биоматериала, содержащего примесь крови, а также изопропиловый спирт и метилацетат, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца и внутреннего контрольного образца составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца ДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца ДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца ДНК.

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как слизь, кровь, элементы тканевого распада и воспаления, местные лекарственные препараты, в том числе содержащиеся в суппозиториях, тальк, спермицид и др. удаляются в ходе выделения ДНК с использованием комплектов/наборов для пробоподготовки. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения ДНК, позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения для генов резистентности составляет 10 копий ДНК на амплификационную пробирку ($2,0 \times 10^3$ копий/мл препарата ДНК). Предел обнаружения установлен путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО).

Предел обнаружения в исследуемом образце зависит от используемого набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК, например, мазки\соскобы из урогенитального тракта, в 500 мкл транспортной среды:

Комплекты реагентов для выделения ДНК / объем элюции				
ПРОБА-НК / 50	ПРОБА-ГС / 100	ПРОБА-НК-ПЛУС / 300	ПРОБА-ГС-ПЛУС / 300	ПРОБА-МЧ-РАПИД / 300
100 копий/образец	200 копий/образец	600 копий/образец		

3.4 Диагностические характеристики

Количество образцов (n) – 105.

Диагностическая чувствительность (95% ДИ) – 100% (98,7 – 100%);

Диагностическая специфичность (95% ДИ) – 100% (99,8 – 100%).

3.5 Сведения о повторяемости и воспроизводимости

Образец	Наличие генов резистентности в образце	Количество совпавших результатов исследования	
		Повторяемость (проведение ПЦР в один день, одним оператором на одном приборе, одна серия набора)	Воспроизводимость (проведение ПЦР в разные дни, на разных приборах, разными операторами, на разных сериях набора)
№1	van A\B	3 повтора из 3	4 повтора из 4
№2	ndm	3 повтора из 3	4 повтора из 4
№3	mec A	3 повтора из 3	4 повтора из 4
№4	ctx-M-1, tem, vim	3 повтора из 3	4 повтора из 4
№5	oxa-51-like, tem oxa-40-like	3 повтора из 3	4 повтора из 4

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СП 1.3.2322-08 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 15-30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

ВНИМАНИЕ! Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора	БакРезиста GLA	БакРезиста GLA Van/Мес
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
Минеральное масло	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1 %	Азид натрия менее 0,1 %

В состав набора входят реагенты, которые содержат **азид натрия** – консервант, в концентрации менее 0,1 %, что является безопасным для конечного пользователя.

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности набора.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов (БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес) требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий («ДТпрайм»¹, «ДТлайт»² или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология»);
- микроцентрифуга-вортекс;
- насадка для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (при необходимости);
- холодильник;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство.

Для предобработки материала для исследования и выделения ДНК:

- бокс биологической безопасности II класса;
- термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или аналогичный с прижимной крышкой;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или пробирки объёмом 1,5 мл с защёлкивающимися крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;

¹ только модели 4М1; 4М3; 4М6; 5М1; 5М3; 5М6; 6М1; 6М3; 6М6.

² только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора;
- центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 000 x g;
- микроцентрифуга-вортекс;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- физиологический раствор (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца;
- набор/комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуются ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют

биологический материал человека и бактериальные культуры из этого биоматериала (мокрота, моча, мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, аспираты, экссудаты).

6.2 Общие требования

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СП 1.3.2322-08.

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка образцов биологического материала человека (6.5).

6.3.1 Мокрота

Взятие материала осуществляют в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объёмом не менее 50 мл.

После сбора материала флакон плотно закрывают и маркируют.

6.3.2 Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20–30 мл. Отбор мочи проводят в специальную сухую стерильную ёмкость объёмом до 60 мл, снабжённую герметично завинчивающейся крышкой.

После сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.3 Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта

Взятие материала осуществляется с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов – зондов, цитощеток или тампонов, в зависимости от источника клинического материала согласно установленной процедуре.

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно прополощите его в течение 10–15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, отожмите избыток жидкости, удалите зонд и выбросьте. Плотнo закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.3.4 Фекалии

Для анализа используют пробы фекалий массой (объемом) примерно 1–3 г (1–3 мл). Пробу в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный сухой флакон.

После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

6.3.5 Аспираты

Взятие материала осуществляют в одноразовые, плотно завинчивающиеся стерильные пробирки объемом 50 мл.

После взятия материала пробирку плотно закрывают крышкой и маркируют.

6.3.6 Экссудат

Забор материала осуществляется с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов – зондов, цитощеток или тампонов, в зависимости от источника клинического материала согласно установленной процедуре.

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно прополощите его в течение 10–15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, отожмите избыток жидкости, удалите зонд и выбросьте. Плотнo закройте крышку пробирки и промаркируйте.

6.3.7 Бактериальные культуры

Взятие материала с жидких и плотных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя.

Поместите одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды в одноразовую пластиковую пробирку объемом 1,5-2,0 мл, в которую предварительно внесено 500 мкл физиологического раствора стерильного.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

6.4.1 Мокрота

Образцы мокроты допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 суток.

6.4.2 Нативные и предварительно обработанные образцы мочи:

Нативные и предварительно обработанные образцы мочи допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – 6 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.3 Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, экссудаты

Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, экссудаты следует транспортировать и хранить согласно инструкциям к рекомендуемым комплектам реагентов для выделения НК (ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД).

6.4.4 Образцы нативных фекалий

Образцы нативных фекалий допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 суток.

6.4.5 Аспират, бактериальные культуры:

Аспират, бактериальные культуры допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – 6 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.5 Подготовка биологического материала человека для исследования.

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования (Приложение А). Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.5.1 Мокрота

6.5.1.1 Способ № 1

1. Перенесите примерно 500 мкл биологического материала в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.
2. Добавьте к пробе мокроты равный объём 10 % трехзамещённого фосфорнокислого натрия $\times 12\text{H}_2\text{O}$, плотно закройте крышкой и интенсивно встряхните.
3. Инкубируйте смесь при температуре 37 °С в течение 18-24 часов, затем нейтрализуйте 1 М HCl до pH 6,8-7,4.
4. Центрифугируйте при 900 x g в течение 20 мин.
5. Слейте надосадочную жидкость в ёмкость с 5 % раствором хлорамина для обеззараживания.
6. Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.
7. Центрифугируйте пробирку при 16 000 x g в течение 10 мин.
8. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

6.5.1.2 Способ № 2

1. В контейнер с образцом добавьте муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина к одной части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.
2. Закройте крышку контейнера, встряхните содержимое и инкубируйте 20-30 мин при комнатной температуре, каждые 2-3 мин встряхивая контейнер.

6.5.2 Моча

1. Перенесите 1,0 мл мочи в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.
2. Центрифугируйте пробирку при 16 000 x g в течение 10 мин.
3. Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.
4. Добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
5. Центрифугируйте пробирку при 16 000 x g в течение 10 мин.
6. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

6.5.3 Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, аспираты, экссудаты, бактериальные культуры с жидких и плотных сред

1. Центрифугируйте пробирку при 16 000 x g в течение 10 мин.
2. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция) при использовании комплектов реагентов ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС или 100 мкл (осадок + жидкая фракция) при использовании комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС и ПРОБА-МЧ-РАПИД.

6.5.4 Фекалии

1. Перенесите ~250 мг (мкл) фекалий в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
2. Встряхните пробирку на вортексе в течение 5-10 с.
3. Центрифугируйте пробирку при 900 x g в течение 2-3 мин.
4. Перенесите 800-1000 мкл надосадочной жидкости в новую одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл, центрифугируйте при 16 000 x g в течение 10 мин.
5. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Дальнейшая обработка указанных выше видов биологического материала осуществляется согласно инструкциям к используемым комплектам реагентов для выделения ДНК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

7.1.1 Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав комплекта реагентов для выделения ДНК, в объеме, указанном в инструкции к комплекту реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

7.2.1 Набор реагентов БакРезиста GLA: промаркируйте по одному стрипу со смесями для амплификации, запечатанными парафином, для каждого исследуемого образца, один для положительного контрольного образца (K+) и один для отрицательного контрольного образца (K-).

Пример: Необходимо проанализировать два образца. Для этого необходимо промаркировать четыре стрипа: два для исследуемых образцов, один для «K+» и один для «K-» (таблица 2).

7.2.2 Набор реагентов БакРезиста GLA Van/Мес: промаркируйте по одной пробирке стрипа (или по одной отдельной пробирке) со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, одну для положительного контрольного образца (K+), и одну для отрицательного контрольного образца (K-).

Пример: Необходимо проанализировать два образца. Для этого необходимо промаркировать четыре пробирки: две для исследуемых образцов, одну для «K+» и одну для «K-» (таблица 2).

Таблица 2 – Пример маркировки стрипов или пробирок для проведения ПЦР

Образцы	БакРезиста GLA	БакРезиста GLA Van/Мес
Образец 1	Стрип 1	Пробирка 1
Образец 2	Стрип 2	Пробирка 2
К-	Стрип 3	Пробирка 3
К+	Стрип 4	Пробирка 4

7.2.3 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.4 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

7.2.5 7.2.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте пробирки/стрипы.

7.2.6 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-ГС и ПРОБА-ГС-ПЛЮС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при 16 000 x g в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа (или только той пробирки), в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК. В пробирки «К+» и «К-»

препарат ДНК не вносится.

7.2.8 Внесите в пробирку (стрип), промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

7.2.9 Внесите в пробирку (стрип), промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.10 Центрифугируйте пробирки (стрипы) в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.11 Установите все пробирки (стрипы) в блок детектирующего амплификатора.

7.2.12 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». Загрузите файлы «BacResista.V1.ini» (для варианта исполнения БакРезиста GLA) или «GLA VanMec.ini» (для варианта исполнения БакРезиста GLA Van/Мес). Добавьте в протокол соответствующие тесты, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.11) и проведите ПЦР. При выборе этих тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5	√	Цикл
	64	0	15			
3	94	0	10	45	√	Цикл
	64	0	15			
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	...	...	Хранение		Хранение

Тесты (ini файлы) для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» предоставляются производителем набора реагентов.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

8.2 Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.

8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам для каждой пробирки в термоблоке.

8.3.1 БакРезиста GLA:

В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторные циклы (Cp), логарифмы концентрации (Lg) для специфических продуктов и индикаторные циклы (Cp) для ВК.

8.3.2 БакРезиста GLA Van/Мес:

В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторные циклы (Cp) для специфических продуктов и ВК.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

8.4 В варианте исполнения БакРезиста GLA после окончания программы программное обеспечение проводит сравнение заданного оператором расположения стрипов с реальным положением маркера Rox, и, если находит несовпадение (при неправильном расположении стрипов), то предупреждает об этом оператора.

В этом случае необходимо проверить расположение стрипов в термоблоке (первая пробирка отмечена голубым буфером) и скорректировать идентификаторы пробирок в протоколе.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

9.1 Учёт и регистрация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 После завершения ПЦР программа отображает в таблице в графе «Результат»: «+» или «-». В этом случае выдается заключение по результатам исследования.

9.3 Учёт и интерпретация результатов реакции для варианта исполнения
БакРезиста GLA

9.3.1 После прохождения амплификации по показателям индикаторного цикла (пороговых циклов, C_p) программным обеспечением автоматически проводится расчёт логарифмов концентрации, которые указываются в строке с названием соответствующего гена резистентности и ОБМ. Сравнивая значения логарифмов, возможно провести полуколичественную оценку:

- доли резистентных микроорганизмов от общего количества бактериальной массы;
- соотношения генов резистентности друг с другом.

9.3.2 Значения логарифма менее 3,0 не высчитываются, но C_p для этих проб отображаются. Это интерпретируется как отрицательный результат, при этом в окне «Анализ оптических измерений» результат указывается как «-», а в бланке ответа - «не выявлено».

9.3.3 Если значение логарифма ОБМ больше 7,0, то для проведения более точной полуколичественной оценки рекомендуется развести препарат ДНК в 10-100 раз и провести повторную амплификацию.

9.3.4 Если значение логарифма ОБМ не указано, а значения логарифмов для генов резистентности указаны, то проведение полуколичественной оценки результатов исследования считается некорректным, но результаты могут учитываться как качественные. Поэтому это интерпретируется как положительный результат, при этом в окне «Анализ оптических измерений» результат указывается как «+», а в бланке ответа - «обнаружено». Это может быть связано с нарушениями в технологии амплификации, в этом случае для возможности проведения полуколичественной оценки требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК.

9.3.5 Значение L_g , указываемое при выявлении генов резистентности должно быть меньше, чем значение L_g ОБМ+0,5. Если это условие не выполняется, то результат исследования считается некорректным, но результаты могут учитываться как качественные. Поэтому это интерпретируется как положительный результат, при этом в окне «Анализ оптических измерений» результат указывается как «+», а в бланке ответа - «обнаружено». Это может быть связано с нарушениями в технологии амплификации, в этом случае для воз-

возможности проведения полуколичественной оценки требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК.

9.3.6 Для образцов, для которых получены отрицательные результаты по трем каналам детекции (исключая пробирку № 3) в графе «Результат» будет указано «нд» (недостовверный результат). В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.3.7 Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследования отрицательного и положительного контрольных образцов для варианта исполнения БакРезиста GLA

Канал детекции				Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox	Cy5		
Положительный контрольный образец					
Значение Ср указано (для всех пробирок)	Значение не учитывается	-	Значение Ср указано (для пробирок №2-8).	+	Результат положительный Результаты поста- новки валидны
Отрицательный контрольный образец					
Значение Lg не указано (для всех пробирок, кроме ОБМ: допуска- ется $Lg \leq 3,5$)	Значение Ср указано (для всех пробирок, кроме пробирки № 3 – без ВК).	-	Значение Lg не указано (для всех пробирок)	-	Результат отрицательный Результаты поста- новки валидны

9.3.8 Принципы интерпретации результатов исследования приведены в таблице А.1 приложения А.

9.4 Учёт и интерпретация результатов реакции для варианта исполнения БакРезиста GLA Van/Мес

9.4.1 Для образцов, для которых получены отрицательные результаты по трем каналам детекции, в графе «Результат» будет указано «нд» (недостовверный результат). В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.4.2 Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты исследования отрицательного и положительного контрольных образцов для варианта исполнения БакРезиста GLA Van/Мес

Канал детекции			Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Su5		
Положительный контрольный образец				
Значение Ср указано	Значение не учитывается	Значение Ср указано	+	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец				
Значение Ср не указано	Значение Ср указано	Значение Ср не указано	-	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

9.4.3 Принципы интерпретации результатов исследования приведены в таблице А.2 приложения А.

9.5 При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице 4 (для варианта исполнения БакРезиста GLA) и таблице 5 (для варианта исполнения БакРезиста GLA Van/Мес) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

9.6 При получении для положительного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице 4 (для варианта исполнения БакРезиста GLA) и таблице 5 (для варианта исполнения БакРезиста GLA Van/Мес), требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

ВНИМАНИЕ! Отрицательный результат, полученный при исследовании, не исключает возможности наличия у бактерий другого механизма резистентности к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам³.

³ World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available at: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Accessed 1 February 2019.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.2 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Набор реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.2 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности, и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

11.3 Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора реагентов		Дата изготовления

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым документом).

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»; ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов (БакРезиста GLA, БакРезиста GLA Van/Мес) следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6., этаж 5, ком. 14, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

8(800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Старший научный сотрудник

ООО «НПФ ДНК-Технология»

к.б.н.

Л.В. Артемова

«27» 05 2020 г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России,
академик РАН, профессор



Г.Т. Сухих

«05» 05 2020 г.

Приложение А

(справочное)

Принципы интерпретации результатов исследования

Учет, регистрация и первичный расчет логарифмов концентрации ДНК возбудителей проводятся программным обеспечением автоматически. В данном приложении изложены общие принципы интерпретации результатов.

Таблица А.1 – БакРезиста GLA

Выбранный флуорофор				Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox	Cy5		
Анализируемые образцы					
Значение Ig указано (для одной или более пробирок №1, 3-8)	Значение не учитывается	-	Значение Ig указано (для одной или более пробирок №2-8)	+	Обнаружены гены, ассоциированные с резистентностью к антибиотикам
Значение Ig не указано (для одной или более пробирок №1, 3-8)	Значение Ср указано (для тех же пробирок, что и по каналу Fam, Cy5), пробирка №3 – без ВК	-	Значение Ig не указано (для одной или более пробирок №2-8)	-	Не обнаружены гены, ассоциированные с резистентностью к антибиотикам*
Значение Ср не указано (для одной или более пробирок №1-8)	Значение Ср не указано (для тех же пробирок, что и по каналу Fam, Cy5), пробирка №3 – без ВК	-	Значение Ср не указано (для одной или более пробирок №2-8)	нд	Результат недостоверный

Таблица А.2 – БакРезиста GLA Van/Мес

Выбранный флуорофор			Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Cy5		
Анализируемые образцы				
Значение Ср указано	Значение не учитывается	Значение Ср не указано	+	Обнаружены гены van A\B, ассоциированные с резистентностью к ванкомицину, тейкопланину.
Значение Ср не указано	Значение не учитывается	Значение Ср указано	+	Обнаружен ген mec A, ассоциированный с резистентностью к метициллину, оксациллину.
Значение Ср указано	Значение не учитывается	Значение Ср указано	+	Обнаружены гены van A\B, mec A, ассоциированные с резистентностью к ванкомицину, тейкопланину, метициллину, оксациллину.
Значение Ср не указано	Значение Ср указано	Значение Ср не указано	-	Не обнаружены гены, ассоциированные с резистентностью к антибиотикам*
Значение Ср не указано	Значение Ср не указано	Значение Ср не указано	нд	Недостоверный результат

*Отрицательный результат, полученный при исследовании, не исключает возможности наличия у бактерий другого механизма резистентности к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам.