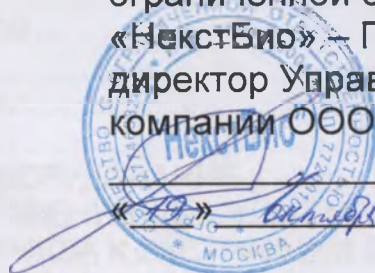


«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио» – Генеральный
директор Управляющей
компании ООО «МБК»

Д.Л. Симачева

2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ДНК
грибов рода *Candida* (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*,
C.parapsilosis и *C.tropicalis*) методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) для диагностики in vitro

«АмплиПрайм[®] Флороценоз-Кандиды»

АмплиПрайм[®]



ООО «НекстБио»,
Российская Федерация, 111394,
город Москва, улица Полимерная, дом 8, стр. 2

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	14
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	15
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100)	17
СОСТАВ	17
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	17
А. Подготовка пробирок для амплификации	17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	18
В. Анализ и интерпретация результатов	19
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)	24
СОСТАВ	24
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	24
А. Подготовка пробирок для амплификации	24
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	27
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	32
СОСТАВ	32
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	32
А. Подготовка пробирок для амплификации	32
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	33
В. Анализ и интерпретация результатов	34
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 4 (комплекты реагентов «АмплиПрайм [®] МАГНО-сорб- УФО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)	39
СОСТАВ	39
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	40
А. Подготовка пробирок для амплификации	40
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	41
В. Анализ и интерпретация результатов	42
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	47
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	47
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	49
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	50

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K-	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» предназначен для количественного определения ДНК грибов рода *Candida*: *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на вульвовагинальный кандидоз.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL¹) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать

¹ ВКО-FL входит в состав комплекта реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из каждого исследуемого материала.

влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* методом ПЦР в режиме «реального времени» основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Концентрацию ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* возможно определить в двух вариантах. В **первом варианте** определяются абсолютные значения концентраций ДНК микроорганизмов, отражающие количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в 1 мл биологического образца (ГЭ/мл). **Второй вариант** расчета концентрации требует проведения параллельного тестирования пробы ДНК с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Во втором варианте рассчитываются нормированные значения концентрации ДНК микроорганизмов, отражающие количество клеток микроорганизмов относительно клеток слизистой оболочки человека.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат

дезоксифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

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

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 5 реакций – амплификация участков ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 5 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК <i>C.albicans</i>	ДНК <i>C.glabrata</i>	ДНК <i>C.krusei</i>	ДНК <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i>	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	ITS-2	ITS-2	ITS-2	ITS-1	искусственно синтезированная последовательность

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

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

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L.

Форма 4 включает комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN.

Формы комплектации 1, 2, 3 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 2 может быть использована совместно с автоматическими станциями приготовления реакционных смесей.

Форма комплектации 4 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», и позволяет выявлять ДНК в количественном формате.

Форма комплектации 4 может быть использована совместно с автоматическими станциями пробоподготовки и приготовления реакционных смесей.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Линейный диапазон измерения и аналитическая чувствительность

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²	Линейный диапазон измерения, ГЭ/мл
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» [®] «АмплиПрайм МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>C. albicans</i>	50	2x10 ² – 2x10 ⁷
				<i>C. glabrata</i>	50	
				<i>C. krusei</i>	50	
				<i>C. parapsilosis</i>	50	
				<i>C. tropicalis</i>	50	

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая чувствительность в отношении каждого из микроорганизмов сохраняется и в присутствии высоких концентраций ДНК других анализируемых микроорганизмов – до 10⁹ ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, HSV 1 и 2 типа, CMV, HPV, а также геномной ДНК человека.

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

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища), помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл.

³ Форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ».

Воспроизводимость, повторяемость и правильность

Воспроизводимость и повторяемость были определены путем тестирования модельного образца биоматериала. Модельный образец биоматериала был приготовлен разведением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК пяти микроорганизмов (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*) в трех диапазонах концентраций (от 2×10^2 до 5×10^2 , от 1×10^4 до 5×10^4 , от 1×10^6 до 5×10^6 ГЭ/мл) в биологическом материале, не содержащем ДНК каких-либо других возбудителей ИППП.

Правильность была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в диапазоне концентрации от 2×10^3 до 2×10^4 ГЭ/мл.

Таблица 3

Воспроизводимость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>C.albicans</i>	от 2×10^2 до 5×10^2	80	2,19	0,04	2,02
<i>C.glabrata</i>		80	2,26	0,06	2,80
<i>C.krusei</i>		80	2,22	0,07	3,34
<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>		80	2,54	0,05	1,78
<i>C.albicans</i>	от 1×10^4 до 5×10^4	80	4,08	0,04	1,08
<i>C.glabrata</i>		80	4,17	0,06	1,35
<i>C.krusei</i>		80	4,17	0,04	0,91
<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>		80	4,50	0,04	0,81
<i>C.albicans</i>	от 1×10^6 до 5×10^6	80	6,11	0,05	0,88
<i>C.glabrata</i>		80	6,20	0,05	0,89
<i>C.krusei</i>		80	6,13	0,04	0,63
<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>		80	6,44	0,09	1,41

Таблица 4

Повторяемость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>C.albicans</i>	от 2×10^2 до 5×10^2	40	2,20	0,04	1,98
<i>C.glabrata</i>		40	2,31	0,05	2,07
<i>C.krusei</i>		40	2,25	0,06	2,45
<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>		40	2,54	0,04	1,57
<i>C.albicans</i>	от 1×10^4 до 5×10^4	40	4,06	0,04	1,05
<i>C.glabrata</i>		40	4,13	0,05	1,09
<i>C.krusei</i>		40	4,17	0,04	0,68
<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>		40	4,50	0,04	0,71
<i>C.albicans</i>	от 1×10^6 до 5×10^6	40	6,15	0,03	0,47
<i>C.glabrata</i>		40	6,23	0,04	0,66

<i>C.krusei</i>		40	6,13	0,02	0,36
<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>		40	6,52	0,02	0,37

Таблица 5

Правильность

Микроорганизм	Количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Установленное значение, lg	Систематическая погрешность (В),	
				lg	%
<i>C.albicans</i>	100	3,80	3,67	0,13	3,54
<i>C.glabrata</i>	100	3,92	3,68	0,24	6,52
<i>C.krusei</i>	100	3,88	3,38	0,5	14,79
<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>	100	4,23	3,98	0,25	6,28

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 6

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды»		Результаты применения референтного метода ⁴							
			<i>C.albicans</i>		<i>C.glabrata</i>		<i>C.krusei</i>		<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	Всего исследовано 1000 образцов	положительных	480	0	180	0	101	0	103	0
		отрицательных	0	520	0	820	0	899	0	897

Были использованы 1000 образцов отделяемого слизистой оболочки влагалища, полученных от женщин с жалобами на выделения, зуд и жжение во влагалище.

Таблица 7

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ⁵ (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %				Диагностическая специфичность ⁶ (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %			
	<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i> , <i>C.tropicalis</i>
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	99	98	97	97	99	99	99	99

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-

⁴ В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-FL» (ПУ № ФСР 2012/14005).

⁵ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁶ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- 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 реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты 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 фильтром⁷. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР,

⁷ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – Safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

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

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,

- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм TCM» (РУ № ФСР 2012/14205), «Транспортная среда для мазков «АмплиПрайм ТС» (РУ № ФСР 2012/14203), «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» (форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ») (РУ № ФСР 2012/14018) или другие рекомендованные Производителем.
2. Зонд гинекологический универсальный (например, ЗГУ «ЦМ», ООО «ЦЕНТРИМЕД», Россия или аналогичный).
3. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

4. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» вариант 100С (РУ № ФСР 2012/14204) или другие рекомендованные Производителем.
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» совместно с автоматическими станциями для экстракции НК:

6. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Заворачивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или одноразовые 96-луночные планшеты (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – для элюции.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до

200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

10. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
12. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
13. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
14. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
15. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) или аналогичная).
16. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК.
17. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
19. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» в случае ручной методики экстракции НК:

20. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
21. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
22. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
23. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
24. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
25. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
26. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
27. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
28. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA

BioSan, Латвия, или аналогичный).

29. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).

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

31. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

32. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

33. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

34. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплектom» FRT-100 FN:

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

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

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

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

36. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).

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

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

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

40. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала

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

41. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
42. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
43. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазки, соскобы).

Мазки (соскобы) со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой из заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Материал из влагалища взять в достаточном количестве. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. В случае использования транспортной среды с муколитиком ее цвет может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого).

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы отделяемого слизистой оболочки влагалища не требуют предварительной подготовки.

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

41. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
42. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
43. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазки, соскобы).

Мазки (соскобы) со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой из заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Материал из влагалища взять в достаточном количестве. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. В случае использования транспортной среды с муколитиком ее цвет может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого).

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы отделяемого слизистой оболочки влагалища не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя и др. может приводить к ингибированию реакции амплификации. Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» и другие рекомендованные Производителем. Порядок работы с комплектом реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» смотрите в инструкции к используемому комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» смотрите в **приложении 1**.

ВНИМАНИЕ! При проведении количественного ПЦР-исследования недопустимо использование комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ» и других экспресс-методов экстракции ДНК.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем **ВКО-FL** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию ДНК в **250 мкл буфера для элюции В**.

Следует учитывать, что ПЦР-комплекс предназначен для амплификации ДНК. В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

Вариант	ПЦР-комплекс	Объем элюата	Объем буфера
1. Вариант FRT-L	ПЦР-комплекс	25	250 мкл
2. Вариант FRT-L	ПЦР-комплекс	25	250 мкл
3. Вариант FRT-L	ПЦР-комплекс	25	250 мкл
4. Вариант FRT-L	ПЦР-комплекс	25	250 мкл
5. Вариант FRT-L	ПЦР-комплекс	25	250 мкл

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 для амплификации фрагментов ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ 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 – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью Флороценоз-Кандиды для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-буфера-К, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью Флороценоз-Кандиды.

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

4. Поставить контрольные реакции:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K1 complex**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9)⁸.

Таблица 8

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁹ и планшетного¹⁰ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты

⁸ Программы амплификации (табл. 8, 9) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

⁹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹⁰ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Приборы роторного типа ⁹				Приборы планшетного типа ¹⁰		
Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов	Температура, °C	Время	Количество 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 каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5**.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>C.albicans</i>	ДНК <i>C.glabrata</i>	ДНК <i>C.krusei</i>	ДНК <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i>	ДНК ВКО-FL

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

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не определены. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не выявлена	Значение C_t для ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>C.albicans</i>, <i>C.glabrata</i>, <i>C.krusei</i>, <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не выявлена.
менее 2×10^2 ГЭ/мл	ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл.
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>C.albicans</i>, <i>C.glabrata</i>, <i>C.krusei</i>, <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл.
более 2×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как

	результат более 2×10^7 ГЭ/мл.
--	--

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

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*

Полученные значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *Candida* на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* производят согласно формуле:

число ГЭ <i>Candida</i> в 1 мл	$\times 10^5 =$	число ГЭ <i>Candida</i> на 10^5 клеток человека
число ГЭ ДНК человека в 1 мл		

где:

- «число ГЭ *Candida* в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *Candida* в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

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

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролиру- емый этап ПЦР- исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Sy5	Sy5.5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
K2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

- Для отрицательного контроля экстракции (OK)
 - по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Sy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
 - по каналу для флуорофора Sy5.5 значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что OK не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Sy5 и/или Sy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
- Для ДНК-калибратора K1 отсутствует значение порогового цикла (Ct) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

4. Для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси Флороценоз-Кандиды** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно

перед проведением ПЦР-исследования.

2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Флороценоз-Кандиды, ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси Флороценоз-Кандиды и ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K1 complex**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 13, 14)¹¹.

¹¹ Программы амплификации (табл. 13, 14) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

Таблица 13

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹² и планшетного¹³ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 14

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ¹²			Приборы планшетного типа ¹³		
	Температура, °C	Время	Количество циклов	Температура, °C	Время	Количество 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 каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

¹² Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹³ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 15

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>C. albicans</i>	ДНК <i>C. glabrata</i>	ДНК <i>C. krusei</i>	ДНК <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i>	ДНК ВКО-FL

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов.

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не определены. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>C.albicans</i>, <i>C.glabrata</i>, <i>C.krusei</i>, <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не выявлена .
менее 2×10^2 ГЭ/мл	ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл .
$X \times 10^Y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>C.albicans</i>, <i>C.glabrata</i>, <i>C.krusei</i>, <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^Y$ ГЭ/мл .
более 2×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат более 2×10^7 ГЭ/мл .

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

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*

Полученные значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *Candida* на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации

ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* производят согласно формуле:

число ГЭ <i>Candida</i> в 1 мл	$\times 10^5 =$	число ГЭ <i>Candida</i> на 10^5 клеток человека
число ГЭ ДНК человека в 1 мл		

где:

- «число ГЭ *Candida* в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *Candida* в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 17 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 17

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК)
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и

- повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- б) по каналу для флуорофора Cy5.5 значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
 3. Для ДНК-калибратора K1 отсутствует значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 17). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 4. Для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 17) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 5. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести

амплификацию и детекцию для этого образца.

СЛУЖБА

ВНИМАНИЕ: данная таблица предназначена для заполнения результатов анализа. В ней необходимо указать все результаты анализа, полученные в ходе проведения исследования. В случае необходимости, можно использовать дополнительные листы для продолжения таблицы.

№ п/п	Наименование образца	Результат анализа	Единица измерения	Значение
1	Взвешивание	Граммы	г	0,0000
2	Измерение объема	Миллилитры	мл	0,0000
3	Измерение температуры	Степени Цельсия	°C	20,00
4	Измерение pH	Единицы pH		7,00
5	Измерение концентрации	Микрограммы на миллилитр	мкг/мл	0,00
6	Измерение времени	Минуты	мин	0,00

ВНИМАНИЕ: данная таблица предназначена для заполнения результатов анализа. В ней необходимо указать все результаты анализа, полученные в ходе проведения исследования. В случае необходимости, можно использовать дополнительные листы для продолжения таблицы.

ВНИМАНИЕ: данная таблица предназначена для заполнения результатов анализа. В ней необходимо указать все результаты анализа, полученные в ходе проведения исследования. В случае необходимости, можно использовать дополнительные листы для продолжения таблицы.

АМПИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

ВНИМАНИЕ: данная таблица предназначена для заполнения результатов анализа. В ней необходимо указать все результаты анализа, полученные в ходе проведения исследования. В случае необходимости, можно использовать дополнительные листы для продолжения таблицы.

ВНИМАНИЕ: данная таблица предназначена для заполнения результатов анализа. В ней необходимо указать все результаты анализа, полученные в ходе проведения исследования. В случае необходимости, можно использовать дополнительные листы для продолжения таблицы.

ВНИМАНИЕ: данная таблица предназначена для заполнения результатов анализа. В ней необходимо указать все результаты анализа, полученные в ходе проведения исследования. В случае необходимости, можно использовать дополнительные листы для продолжения таблицы.

ВНИМАНИЕ: данная таблица предназначена для заполнения результатов анализа. В ней необходимо указать все результаты анализа, полученные в ходе проведения исследования. В случае необходимости, можно использовать дополнительные листы для продолжения таблицы.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для амплификации фрагментов ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды- Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл или 96-луночный планшет для ПЦР
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

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

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ 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 – 25 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок или достать 96-луночный планшет для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью Флороценоз Кандиды-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки или лунки планшета внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При работе с планшетом, пробы ДНК и контрольные образцы добавлять аккуратно на дно лунки, не допуская образования капель на стенке.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл K1 complex**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл K2 complex**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K–**.

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

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл.18, 19)¹⁴.

Таблица 18

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁵ и планшетного¹⁶ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

¹⁴ Программы амплификации (табл. 18, 19) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

¹⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹⁶ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 19

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ¹⁵			Приборы планшетного типа ¹⁶		
	Температура, °C	Время	Количество циклов	Температура, °C	Время	Количество 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 каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5**.

- Установить пробирки или планшет в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 20

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>C. albicans</i>	ДНК <i>C. glabrata</i>	ДНК <i>C. krusei</i>	ДНК <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i>	ДНК ВКО-FL

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

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 21

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Значение	Расшифровка
Невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i> не определены. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i> не выявлена	Значение C_t для ДНК <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. krusei</i>, <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i> не выявлена.
менее 2×10^2 ГЭ/мл	ДНК <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл.
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации ДНК <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> и <i>C. tropicalis</i> (ГЭ/мл) находится в пределах

	линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл.
более 2×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат более 2×10^7 ГЭ/мл.

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

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *Candida* на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* производят согласно формуле:

число ГЭ <i>Candida</i> в 1 мл			число ГЭ <i>Candida</i> на 10^5 клеток человека
число ГЭ ДНК человека в 1 мл	$\times 10^5 =$		

где:

- «число ГЭ *Candida* в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *Candida* в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 22 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 22

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
K2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

- Для отрицательного контроля экстракции (OK)
 - по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
 - по каналу для флуорофора Cy5.5 значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что OK не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Для отрицательного контроля ПЦР (K–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации

- источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
3. Для ДНК-калибратора K1 отсутствует значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 22). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
4. Для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 22) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 4 (комплекты реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» вариант 100С – комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ¹⁷	50	1 флакон
Компонент А-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	2 пробирки
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	13 пробирок
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов вариант 100С рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

¹⁷ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси Флороценоз-Кандиды** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на несколько реакций.

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

2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Флороценоз-Кандиды, ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси Флороценоз-Кандиды** и **ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K1 complex**.

б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2**

complex.

- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл.23, 24)¹⁸.

Таблица 23

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁹ и планшетного²⁰ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 24

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ¹⁹			Приборы планшетного типа ²⁰		
	Температура, °C	Время	Количество циклов	Температура, °C	Время	Количество 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	

¹⁸ Программы амплификации (табл. 23, 24) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

¹⁹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

²⁰ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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 каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5**.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 25

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>C.albicans</i>	ДНК <i>C.glabrata</i>	ДНК <i>C.krusei</i>	ДНК <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i>	ДНК ВКО-FL

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов.

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* в 1 мл исследуемых и

контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 26

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не определены. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>C.albicans</i>, <i>C.glabrata</i>, <i>C.krusei</i>, <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> не выявлена.
менее 2×10^2 ГЭ/мл	ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл.
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>C.albicans</i>, <i>C.glabrata</i>, <i>C.krusei</i>, <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл.
более 2×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>C.albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат более 2×10^7 ГЭ/мл.

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

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*

Полученные значения концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *Candida* на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно

клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* производят согласно формуле:

$\frac{\text{число ГЭ Candida в 1 мл}}{\text{число ГЭ ДНК человека в 1 мл}}$	$\times 10^5 =$	$\text{число ГЭ Candida на } 10^5 \text{ клеток человека}$
--	-----------------	--

где:

- «число ГЭ *Candida* в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *Candida* в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 27 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 27

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше	определено меньше	определено меньше	определено меньше	определено меньше

		граничного	граничного	граничного	граничного	граничного
--	--	------------	------------	------------	------------	------------

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК)
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
 - б) по каналу для флуорофора Cy5.5 значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
3. Для ДНК-калибратора K1 отсутствует значение порогового цикла (Ct) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 27). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
4. Для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла (Ct) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 27) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в

- требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 и вариант FRT-100 FN при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н. ПЦР-буфер-Н хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 3. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Форма комплектации 4. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ВКО-FL. ВКО-FL хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н. ПЦР-буфер-Н хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь Флороценоз-Кандиды хранить в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио» (111394 г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2) в отдел по работе с рекламациями (тел. (495) 620-08-73, е-

mail: info@nextbio.ru).

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер 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



Беречь от влаги



Хрупкое. Осторожно



Верх

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из исследуемых образцов с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции детальная информация по процедуре экстракции ДНК из биологических образцов изложена в инструкции по использованию автоматической станции.

Порядок работы

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет неприятный запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. Прогреть **лизирующий раствор МАГНО-сорб** при температуре **60 °С** до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Промаркировать.
3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл **ВКО-FL, компонент А-1 и магнетизированную силику** из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL, 10 мкл компонента А-1 и 10 мкл магнетизированной силики.**²¹ При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на один образец больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО-FL, мкл	Компонент А-1, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	70
12	130	130	130
18	190	190	190
24	250	250	250

4. Внести в пробирки объемом 1,5 мл по **30 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики**.
5. Добавить в пробирки по **450 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
6. Внести в подготовленные пробирки по **100 мкл** исследуемых образцов.
7. В пробирку отрицательного контроля (**ОК**) экстракции внести **100 мкл ОКО**.
8. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**.
9. Осадить капли на вортeксе и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.

²¹ Предварительное смешивание ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики позволяет упростить процедуру экстракции. Возможно раздельное внесение этих реагентов.

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 7**, плотно закрыть крышки.
12. Смыть магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, затем осадить капли на вортексе.
13. Переставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив на **1 мин.**
14. Отобрать надосадочную жидкость, аналогично п. 10. Перенести пробирки в обычный штатив.
15. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
16. Добавить в пробирки по **100 мкл буфера для элюции В**, перемешать на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию ДНК в **250 мкл буфера для элюции В**.

17. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °C** на **5 мин.**
18. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин.** Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК для проведения ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °C в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °C в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °C в течение года. Для этого необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

Пронумеровано, прошито и скреплено

57 лист (а/ов)

Руководитель Общества с ограниченной
ответственностью «НекстБио» --
Генеральный директор Управляющей
компаний ООО «МБК»

Д.Л. Симачева

