УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 31.12.09г. № 10914-Пр/09

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____В.И.Покровский
«__»_____ 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Candida albicans*
в клиническом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Candida albicans*-FL»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 10
ВАРИАНТ FEP 11
СОСТАВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 13
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации 13
Б. Проведение амплификации 14
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ 15
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 16
ВАРИАНТ FRT 18
СОСТАВ 18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 20
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 20
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 21
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации 21
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 22
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 23
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 26

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- Федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Candida albicans*-FL»** предназначен для выявления ДНК *Candida albicans* путем амплификации специфического фрагмента ДНК данного микроорганизма методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путем экстракции ДНК из соскобного отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротовой полости, образцов мочи человека. Для экстракции (выделения) ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Candida albicans* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию (выделение) ДНК из образцов клинического материала, амплификацию фрагмента ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans* при помощи специфичных к нему праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта FRT - непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ
Набор реагентов выпускается в 2 вариантах

Вариант FEP

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-1000 (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 5 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 6 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 7 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4, 5, 6 и 7 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая взятие клинического материала, экстракцию (выделение) из него ДНК и амплификацию ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

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

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-1000 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 5 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 6 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 7 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4, 5, 6 и 7 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая взятие клинического материала, экстракцию (выделение) из него ДНК и амплификацию ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Набор для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
Соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	«Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» Варианты FEP и FRT	$1x10^3$ ГЭ/мл [1]
Моча [2]	-	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	$2x10^3$ ГЭ/мл

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis; Lactobacillus spp.; Escherichia coli; Candida glabrata; Candida krusei; Staphylococcus aureus; Streptococcus pyogenes; Streptococcus agalactiae; Mycoplasma hominis; Ureaplasma urealyticum; Ureaplasma parvum; Mycoplasma genitalium; Neisseria flava; Neisseria subflava; Neisseria sicca; Neisseria mucosa; Neisseria gonorrhoeae; Trichomonas vaginalis; Treponema pallidum;*

[1] Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в указанную транспортную среду.
[2] Требуется предобработка образцов мочи.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Toxoplasma gondii; HSV 1 и 2 типа; *CMV; HPV.*

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Использовать наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов. Для каждой процедуры использовать новый наконечник.
- Следует рассматривать образцы как потенциально вызывающие инфекцию и хранить в биологическом кабинете в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Уничтожать образцы и неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Спецификация по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.
- В лаборатории нельзя есть, пить, курить, использовать косметику, снимать или надевать контактные линзы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда - «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ТУ 9398-098-01897593-2009) или «Транспортная среда для мазков» (ТУ 9398-088-01897593-2009), или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1–3 (вариант FEP и вариант FRT).
2. Комплект реагентов для выделения ДНК - «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2009) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1–3 (вариант FEP и вариант FRT).
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК - согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100 F – от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

соответствии с используемыми комплектами реагентов).

9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
11. Емкость для сброса наконечников.

<u>При работе с «ПЦР-комплектом» вариант FEP:</u>

12. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), «MaxyGene» («Axygen», США), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») или аналогичные).
13. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «ALA-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
14. Пластиковая пипетка для минерального масла (для работы с «ПЦР-комплектом» вариант FEP-1000).

<u>При работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT:</u>

15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия), «iCycler iQ5» («Bio-Rad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные.
16. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100 F:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, «Axygen», США) - при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, «Axygen», США), или пробирки для ПЦР к «Rotor-Gene», объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, «Corbett Research», Австралия; «Qiagen», Германия) – при использовании прибора роторного типа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, ротовой полости, образцы мочи (осадок первой порции утренней мочи) человека.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВАРИАНТ FEP
СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *Candida albicans*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон-red[3]	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР[4]	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-1000 – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *Candida albicans*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	1100 пробирок объемом 0,5 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	5,5	2 флакона
ПЦР-смесь-Фон-red[3]	Прозрачная жидкость красного цвета	2,5	1 флакон
Минеральное масло для ПЦР[4]	Бесцветная вязкая жидкость	40	1 флакон
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

[3] Реагент используется при исследовании проб ДНК, выделенных с помощью наборов «ДНК-сорб-АМ» или «ДНК-сорб-В».

[4] Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Комплект реагентов рассчитан на проведение 1100 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100[5] – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

К комплекту реагентов «ДНК-сорб-АМ» прилагаются следующие реагенты:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)[6]**:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)	Прозрачная жидкость розового цвета	0,5	100 пробирок

Транспортная среда для мазков[7]**:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых (клинических) образцов;

[5] Входит в состав форм комплектации 4, 5, 6 и 7.
[6] Входит в состав форм комплектации 4 и 6.
[7] Входит в состав форм комплектации 5 и 7.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции (выделения) ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

При использовании форм выпуска набора 4 – 7 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Candida albicans*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с **ПЦР-смесью-1-FL *Candida albicans*** на поверхность застывшего воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *Candida albicans.***

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. Приготовить образец **«Фон».** Для этого в пробирку с **ПЦР-смесью-1-FL** ***Candida albicans*** на поверхность застывшего воска внести **20 мкл ПЦР-смеси-Фон-red**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

ВНИМАНИЕ! Реагент **ПЦР-смесь-Фон-red** используется при исследовании проб ДНК, выделенных с помощью наборов «ДНК-сорб-АМ» или «ДНК-сорб-В». При использовании других наборов реагентов для экстракции ДНК, рекомендованных ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, необходимо следовать инструкции к используемому набору.

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных путем экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
6. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного.**
   в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования «**АмплиСенс-1-FEP**» (см. табл. 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 ºС (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Программа «АмплиСенс-1-FEP»

	«Терцик»			«GeneAmp PCR System 2700»			«Gradient Palm Cycler», «MaxyGene»		
Цикл	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Циклы
0	**95**	Пауза		**95**	Пауза		**95**	Пауза	
1	**95**	5 мин	1	**95**	5 мин	1	**95**	5 мин	1
2	**95**	2 с	35	**95**	20 с	20	**95**	2 с	24
	65	5 с		**65**	25 с		**65**	10 с	
	72	5 с		**72**	30 с		**72**	10 с	
3	**95**	2 с	9	**95**	20 с	24	**95**	2 с	20
	60	10 с		**60**	30 с		**60**	15 с	
	72	5 с		**72**	30 с		**72**	10 с	
4	**95**	2 с	1	**95**	20 с	1	**95**	2 с	1
	60	10 с		**60**	30 с		**60**	15 с	
5	**10**	Хранение		**10**	Хранение		**10**	Хранение	

Примечание – Программы термоциклирования для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам[8]:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans*.
- по каналу JOE (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта

[8] Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

амплификации ДНК ВКО.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, полученных путем экстракции из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Candida albicans* **обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения.
- ДНК *Candida albicans* **не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения, и сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения.

Если для пробы получен **невалидный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	JOE	
В–	Экстракция ДНК	**Ниже** порогового значения	**Выше** порогового значения	«–» или «ОК»
К–	ПЦР	**Ниже** порогового значения	**Ниже** порогового значения	«нд»
К+	ПЦР	**Выше** порогового значения	**Выше** порогового значения	«+» или «ОК»

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналу FAM ниже порогового значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Candida albicans.*
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу FAM выше порогового значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Candida albicans,* начиная с этапа экстракции ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВАРИАНТ FRT
СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *Candida albicans*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *Candida albicans*	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-1000 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает**:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *Candida albicans*	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	10 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 1100 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100[9]– комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

К комплекту реагентов «ДНК-сорб-АМ» прилагаются следующие реагенты:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)[10]**:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)	Прозрачная жидкость розового цвета	0,5	100 пробирок

[9] Входит в состав форм комплектации 4, 5, 6 и 7.
[10] Входит в состав форм комплектации 4 и 6.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Транспортная среда для мазков[11]:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции (выделения) ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракцию ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL.

При использовании форм выпуска набора 4-7 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

[11] Входит в состав форм комплектации 5 и 7.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

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.

А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Candida albicans*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *Candida albicans***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного.**
   в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-) –** внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и FRT-1000 F

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

1. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT.** Перемешать содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смесь-1-FL *Candida albicans,* ПЦР-смесь-2-FRT, полимераза (TaqF)** и осадить

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.

2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций (включая 2 контроля ПЦР) смешать в отдельной пробирке 10*(N+1) мкл **ПЦР-смеси-1-FL *Candida albicans***, 5,0*(N+1) мкл **ПЦР-смеси-2-FRT** и 0,5*(N+1) мкл **полимеразы (TaqF)**.
4. Перемешать подготовленную смесь и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
   в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-) –** внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала **«АмплиСенс-1»** (см. табл. 3).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-1»

	Приборы роторного типа[12]			Приборы планшетного типа[13]		
Цикл	Температура, °С	Время	Число повторов циклов	Температура, °С	Время	Число повторов 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 и JOE (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам)[14].

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans,*
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал,

[12] Например, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» или аналогичные.
[13] Например, «iCycler», «iQ5», «Mx3000P», «Mx3000», «ДТ-96» или аналогичные.
[14] Названия каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «*Ct*» в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Candida albicans* **обнаружена***,* если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Candida albicans* **не обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора FAM, и по каналу для флуорофора JOE значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также методические рекомендации ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции (выделения) ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	**Контролируемый этап ПЦР-исследования**	**Значение порогового цикла, *Ct***	
		по каналу для флуорофора FAM	**по каналу для флуорофора JOE**
В-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Candida albicans*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу FAM зафиксировано значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Candida albicans*, начиная с этапа экстракции ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и FRT-1000 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

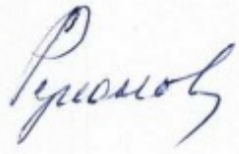
Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Candida albicans* хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Candida albicans*-FL» направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» можно оставить, заполнив анкету потребителя на сайте www.amplisens.ru.

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru