Приказом Росздравнадзора
от 09.06.12г. № 2854-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«30» июня 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для одновременного выявления ДНК *Candida albicans*, *Candida glabrata* и *Candida krusei* в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *C.albicans / C.glabrata / C.krusei*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL»

АмплиСенс®

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 8
ФОРМАТ FRT 9
СОСТАВ 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 11
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 11
А. Подготовка пробирок для проведения ампификации 11
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 13
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 13
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 17
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 18

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
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *C.albicans / C.glabrata / C.krusei*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL»** предназначен для одновременного выявления ДНК *Candida albicans, Candida glabrata* и *Candida krusei* путем амплификации специфических фрагментов ДНК данных микроорганизмов 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, прямой кишки, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы глаз, образцов мочи, секрета предстательной железы человека. Для экстракции (выделения) ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Candida albicans, Candida glabrata* и *Candida krusei* методом мультиплексной 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 непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция

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

одновременной амплификации фрагментов ДНК *Candida albicans, Candida glabrata* и *Candida krusei* при помощи специфичных к каждому из них 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. К олигонуклеотидным зондам, специфичным к различным ДНК-мишеням, прикреплены различные флуоресцентные метки. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации каждой ДНК-мишени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FRT осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в **8** 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 «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

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

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

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

Форма 8 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

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

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

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, Candida glabrata* и *Candida krusei* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 8 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 8 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для ПЦР-амплификации и детекции	Микро-организм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл[1]
Соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта[2]	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	*Candida albicans*	$1x10^3$
			Candida glabrata	$1x10^3$
			Candida krusei	$1x10^3$
Моча[3]	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	*Candida albicans*	$2x10^3$
			Candida glabrata	$2x10^3$
			Candida krusei	$2x10^3$

Аналитическая чувствительность в отношении каждого из микроорганизмов сохраняется и в присутствии высоких концентраций ДНК двух других анализируемых микроорганизмов – до 10^9 ГЭ/мл.

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

[2] Соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, помещенное в «Транспортную среду для мазков» или «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)»

[3] Требуется предобработка образцов мочи.

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

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis; Lactobacillus* spp.*; Escherichia coli; Staphylococcus* spp.*; Streptococcus* spp.*; Chlamydia trachomatis; Mycoplasma hominis; Ureaplasma urealyticum; Ureaplasma parvum; Mycoplasma genitalium; Candida albicans; Candida glabrata; Candida krusei; Neisseria* spp.*; Neisseria gonorrhoeae; Trichomonas vaginalis; Treponema pallidum; 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», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности»

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- 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».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации и детекции – пробирок,

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

содержащих продукты ПЦР, недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- 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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1–3.
2. Комплект реагентов для выделения ДНК - «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1–3.
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-комплект» 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 пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для

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

выделенных проб ДНК.

10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплект» 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.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Материалом для исследования служат соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, отделяемое конъюнктивы глаз, образцы мочи (осадок первой порции утренней мочи), секрет предстательной железы человека.

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

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость[4]	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. Входит в состав форм комплектации 4, 5, 6 и 7.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ):

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

Входит в состав форм комплектации 4 и 6.

Транспортная среда для мазков:

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

Входит в состав форм комплектации 5 и 7.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Candida albicans, Candida glabrata* и *Candida krusei* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» –

[4] При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

включает:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL ***C.albicans / C.glabrata / C.krusei*** раскапана под воск	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 фрагментов ДНК *Candida albicans, Candida glabrata* и *Candida krusei* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL ***C.albicans / C.glabrata / C.krusei***	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 фрагментов ДНК *Candida albicans, Candida glabrata* и *Candida krusei* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем,мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL ***C.albicans / C.glabrata / C.krusei***	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

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

Реактив	*Описание*	*Объем,мл*	*Кол-во*
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.

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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии 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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии 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».

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

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

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *C.albicans / C.glabrata / C.krusei*** 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 *C.albicans / C.glabrata / C.krusei***.
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-смесь-2-FRT.** Перемешать содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смесь-1-FL *C.albicans / C.glabrata / C.krusei,* ПЦР-смесь-2-FRT, полимераза (TaqF)** и осадить 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 *C.albicans / C.glabrata / C.krusei***, 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 (1-2 с).
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**

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

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).

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-1»

	Приборы роторного типа[5]			**Приборы планшетного типа[6]**		
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, JOE, ROX и Cy5 (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

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

[5] например, Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.
[6] например, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Candida albicans;*
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Candida glabrata;*
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Candida krusei;*
- по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, 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 glabrata* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для детекции флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- **ДНК *Candida krusei* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для детекции флуорофора **ROX** определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- **ДНК *Candida albicans, Candida glabrata* и *Candida krusei* не обнаружены** если для данной пробы в таблице результатов соответственно по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице

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

результатов по каналу для флуорофора Cy5 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 детекции флуорофора Cy5 и по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX. 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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии 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 положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции 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 флуорофоров FAM, JOE, ROX	**по каналу для флуорофора Cy5**
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 каналам FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, для которых отсутствует значение порогового цикла, соответственно, по каналам FAM и/или JOE и/или ROX.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) или/и отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам FAM или/и JOE или/и ROX зафиксировано значение порогового цикла Ct необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов,

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

для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам FAM или/и JOE, или/и ROX.

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. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ», «Транспортную среду для мазков», «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» хранить при температуре от 2 до 25 °С. ВКО комплексный, ВКО-FL и ОКО (из комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ») хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *C.albicans* / *C.glabrata* / *C.krusei* 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® *C.albicans / C.glabrata / C.krusei*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL»** направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)[7].

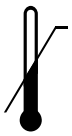
Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Зав. лабораторией микробиологии
НИИАГ им. Д.О.Отта СЗО РАМН
д.м.н, профессор — А.М.Савичева

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
LOT	Код партии		Максимальное число тестов
IVD	Изделие для *in vitro* диагностики		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

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