Приказом Росздравнадзора
от 29.10.2012г. № 2176-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
«26» 10 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для одновременного выявления и количественного определения ДНК грибов рода *Candida* (*C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis)* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-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

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 9
ФОРМАТ FRT 10
СОСТАВ 10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 13
А. Подготовка пробирок для амплификации 13
А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 13
А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и вариант FRT-1000 F 13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 19
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 21

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
В–	- Отрицательный контроль экстракции
ИППП	- Инфекции, передаваемые половым путем
К+	- Положительный контроль ПЦР
К–	- Отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ПКО	- Положительный контрольный образец
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-FL»** предназначен для одновременного выявления и количественного определения ДНК грибов рода *Candida*: *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* методом мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для исследования служат пробы ДНК, полученные путем экстракции из соскобного отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, мазков со слизистых оболочек полости рта и ротоглотки, образцов мочи.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление и количественное определение содержания ДНК пяти видов *Candida* spp. с помощью мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию фрагмента ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится в режиме «реального времени». 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 амплификации при помощи специфичных праймеров и фермента

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

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

Taq-полимеразы с одновременной флуоресцентной детекцией при помощи специфичных флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. 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 непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Результаты амплификации ДНК *C.albicans, C.glabrata* и *C.krusei* регистрируются отдельно для каждого вида по трем различным каналам флуоресцентной детекции, результаты амплификации ДНК *C.parapsilosis* и *C.tropicalis* регистрируются совместно по четвертому каналу флуоресцентной детекции. По каналу Cy5.5/Crimson детектируется продукт амплификации ВКО-FL (внутреннего контрольного образца).

Канал детекции	FAM[2]	JOE[2]	ROX[2]	Cy5[2]	Cy5.5[2]
Выявляется ДНК	ДНК *C.albicans*	ДНК *C.glabrata*	ДНК *C.krusei*	ДНК *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*	ДНК ВКО

Количественное определение ДНК методом ПЦР в режиме «реального времени» основывается на существовании линейной зависимости между логарифмом исходной концентрации ДНК-мишени в исследуемом образце и пороговым циклом *Ct*, соответствующим началу экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала. Для выполнения количественного анализа одновременно проводят амплификацию с детекцией в режиме «реального времени» для проб ДНК, полученных из клинических образцов, и для ДНК-калибраторов – образцов с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам, полученным для ДНК-калибраторов, автоматически строится калибровочный график. Затем для каждого из исследуемых образцов по полученному для него значению порогового цикла *Ct* с помощью калибровочного графика автоматически рассчитывается концентрация соответствующей ДНК-мишени.

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

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

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 6 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-100 F.

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

Форма 6 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации фрагментов ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* 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 и 5 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 6 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Микро-организм	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл[3]
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, полости рта и ротоглотки	«Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» или транспортная среда «ТС-ЭДЭМ»	«ДНК-сорб-АМ»	*C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis, C.tropicalis*	ПЦР комплект варианты FRT, FRT-100 F, FRT-1000 F	$1x10^2$
Моча[4]	—	«ДНК-сорб-АМ»	*C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis, C.tropicalis*	ПЦР комплект варианты FRT, FRT-100 F, FRT-1000 F	$1x10^2$

Линейный диапазон измерений

Линейный диапазон измерений для количественного определения каждого из выявляемых микроорганизмов составляет от 200 до $2x10^5$ ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Candida albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis, C.tropicalis, Gardnerella vaginalis, Lactobacillus* spp., *Escherichia coli, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria* spp., *Mycoplasma genitalium, 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

[3] Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в указанную транспортную среду.
[4] Для образцов мочи требуется предварительная обработка для получения осадка из 1 мл мочи.

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

медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании

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

работы.

- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ТУ 9398-098-01897593-2009), или «Транспортная среда для мазков» (ТУ 9398-088-01897593-2009), или транспортная среда «ТС-ЭДЭМ», или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1, 2 и 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, 2 и 3.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
5. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах (например, Axygen, США).
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 (или более) независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

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

13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100 F и вариант FRT-1000 F:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой – при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Материалом для исследования служат: соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, мазки со слизистых оболочек полости рта и ротоглотки, помещенные в транспортные среды, выпускаемые или рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, а также образцы мочи.

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[5]	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 и 5.

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 формы комплектации 4 и 5.

[5] 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

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для одновременной амплификации и количественного определения ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды		Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red		Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**CND1**	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	CND2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для одновременной амплификации и количественного определения ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды		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
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**CND 1**	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	CND 2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-1000 F – комплект реагентов для одновременной амплификации и количественного определения ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

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

ФОРМАТ FRT

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды		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
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирка
ДНК-калибраторы	**CND 1**	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
	CND 2	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК грибов рода *Candida* (*C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis u C.tropicalis*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из клинического материала необходимо использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для проведения количественного ПЦР-исследования, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. **Недопустимо использование комплекта реагентов «ЭДЭМ» и других экспресс-методов экстракции ДНК.**

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

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

При использовании форм комплектации набора 3 и 4 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».
Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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 ФлороЦеноз / Кандиды** 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 ФлороЦеноз / Кандиды**.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
   б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
   в) **калибраторы (CND1, CND2)** – в одну пробирку внести **10 мкл** ДНК-калибратора **CND1**, во вторую пробирку – **10 мкл** ДНК-калибратора **CND2**.

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

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

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

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

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды**
- **5 мкл** смеси **ПЦР-смеси-2-FRT** и **полимеразы (TaqF)**

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

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

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

2. Встряхнуть на вортексе пробирку с **ПЦР-смесью-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды,** сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1.** Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **четырех контрольных реакций: CND1, CND2, К– и В–.**

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

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды, ПЦР-смеси-2-FRT** с **полимеразой (TaqF)**, приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
   б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
   в) **ДНК-калибраторы (CND1, CND2)** – в одну пробирку внести **10 мкл** ДНК-

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

калибратора **CND1,** во вторую пробирку – **10 мкл** ДНК-калибратора **CND2**.

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. 1).

Таблица 1

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа[6]			Приборы планшетного типа[7]		
	Темпера-тура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпера-тура, °С	Время	Кол-во циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по пяти каналам: для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 и Cy5.5.

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.albicans*;**

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

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

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

- по каналу для флуорофора **JOE** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.glabrata*;**
- по каналу для флуорофора **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.krusei*;**
- по каналу для флуорофора **Cy5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ***C.parapsilosis*** или/и ***C.tropicalis;***
- по каналу для флуорофора **Cy5.5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК **внутреннего контроля (ВКО-FL)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* ДНК-калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК обнаруженного вида ***Candida* spp**.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов (стандартов) указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного контроля амплификации, отрицательного контроля экстракции ДНК и ДНК-калибратора CND1, в соответствии с таблицей оценки результатов контролей (табл. 2), и показатель эффективности амплификации E находится в диапазоне, указанном во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла *Ct*	
		по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5	по каналу для флуорофора Cy5.5
В–	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
CND1	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Не оценивается

Результат количественного ПЦР-исследования считается недостоверным в следующих случаях:

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

1. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) регистрируется значение порогового цикла *Ct* по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, или/и ROX, или/и Cy5. В этом случае необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, или/и ROX, или/и Cy5.
2. Если для ДНК калибраторов ПЦР (CND1, CND2) значения порогового цикла по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 отсутствуют или превышают указанное граничное значение, или показатель эффективности E по графику стандартов меньше значения, указанного во вкладыше. В этом случае необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
3. Если для исследуемого образца отсутствуют значения пороговых циклов *Ct* по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 или полученное число копий ДНК составляет менее 100, а по каналу для флуорофора Cy5.5 значение *Ct* отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо повторно провести анализ для данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Детальная информация по учету результатов изложена в методических рекомендациях к данному набору реагентов.

Значения концентраций ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* отражают общее содержание данных микроорганизмов во взятом клиническом материале, помещенном в транспортную среду. По заданным значениям для ДНК-калибраторов *C.albicans, C.glabrata, C.krusei* и *C.parapsilosis+C.tropicalis* программой прибора автоматически рассчитываются исходные значения количества копий ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei u C.parapsilosis+C.tropicalis* в реакционной пробирке и выдаются в соответствующей графе в таблице результатов (см. описание для вашего прибора в методических рекомендациях). Полученные значения используются для расчета количества геномных эквивалентов соответствующего вида *Candida,* содержащихся в 1 мл исходного клинического образца, по формуле:

[Число копий] ДНК *Candida* x K = [Число геномных эквивалентов] на 1 мл (ГЭ/мл)

ВНИМАНИЕ! Коэффициент **К** для расчета результата в ГЭ/мл указан во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Если полученное значение составляет более $2x10^5$ ГЭ/мл, то указывается результат «более $2x10^5$ ГЭ/мл», если полученное значение составляет менее 200 ГЭ/мл, то указывается результат «менее 200 ГЭ/мл» (с учетом линейного диапазона набора).

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

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 вариант FRT при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ», «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» хранить при температуре от 2 до 25 °С.

Реагенты 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-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды хранить в защищенном от света месте.

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

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

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

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента
Российской Федерации — Е.Л.Никонов

[8] 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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

	Объем реагентов на указанное количество реакций, мкл	
Объем реагентов на одну реакцию, мкл	10,0	5,0
Количество исследуемых клинических образцов	ПЦР-смесь-1-FL ФлороЦеноз / Кандиды[9]	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)[9]
1	60	30
2	70	35
3	80	40
4	90	45
5	100	50
6	110	55
7	120	60
8	130	65
9	140	70
10	150	75
11	160	80
12	170	85
13	180	90
14	190	95
15	200	100
16	210	105
17	220	110
18	230	115
19	240	120
20	250	125
21	260	130
22	270	135
23	280	140
24	290	145
25	300	150
30	350	175

[9] Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки 4 контрольных реакций: CND1, CND2, B– и K–.

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
RUO	Только для исследовательских целей		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