IVD

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

«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .. 12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК 13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 13
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100) 15
  СОСТАВ 15
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 15
    А. Подготовка пробирок для амплификации 15
    Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 16
    В. Анализ и интерпретация результатов 17
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN) 22
  СОСТАВ 22
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 22
    А. Подготовка пробирок для амплификации 22
    Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 23
    В. Анализ и интерпретация результатов 25
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L) 29
  СОСТАВ 29
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 29
    А. Подготовка пробирок для амплификации 29
    Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 30
    В. Анализ и интерпретация результатов 31
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 36
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 36
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 38

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
К1, К2	- ДНК-калибраторы
К–	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL[1]) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать

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

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

влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1

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

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

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

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

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

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

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Линейный диапазон измерения и аналитическая чувствительность

Таблица 2

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

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

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

Аналитическая специфичность

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

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

[2] Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища), помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл.
[3] Форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ».

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

Воспроизводимость, повторяемость и правильность

Воспроизводимость и повторяемость были определены путем тестирования модельного образца биоматериала. Модельный образец биоматериала был приготовлен разведением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК пяти микроорганизмов (*C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis, C.tropicalis)* в трех диапазонах концентраций (от $2x10^2$ до $5x10^2$, от $1x10^4$ до $5x10^4$, от $1x10^6$ до $5x10^6$ ГЭ/мл) в биологическом материале, не содержащем ДНК каких-либо других возбудителей ИППП.

Правильность была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в диапазоне концентрации от $2x10^3$ до $2x10^4$ ГЭ/мл.

Таблица 3

Воспроизводимость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
C.albicans	от $2x10^2$ до $5x10^2$	80	2,19	0,04	2,02
C.glabrata		80	2,26	0,06	2,80
C.krusei		80	2,22	0,07	3,34
C.parapsilosis, C.tropicalis		80	2,54	0,05	1,78
C.albicans	от $1x10^4$до $5x10^4$	80	4,08	0,04	1,08
C.glabrata		80	4,17	0,06	1,35
C.krusei		80	4,17	0,04	0,91
C.parapsilosis, C.tropicalis		80	4,50	0,04	0,81
C.albicans	от $1x10^6$до $5x10^6$	80	6,11	0,05	0,88
C.glabrata		80	6,20	0,05	0,89
C.krusei		80	6,13	0,04	0,63
C.parapsilosis, C.tropicalis		80	6,44	0,09	1,41

Таблица 4

Повторяемость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
C.albicans	от $2x10^2$ до $5x10^2$	40	2,20	0,04	1,98
C.glabrata		40	2,31	0,05	2,07
C.krusei		40	2,25	0,06	2,45
C.parapsilosis, C.tropicalis		40	2,54	0,04	1,57
C.albicans	от $1x10^4$до $5x10^4$	40	4,06	0,04	1,05
C.glabrata		40	4,13	0,05	1,09
C.krusei		40	4,17	0,04	0,68
C.parapsilosis, C.tropicalis		40	4,50	0,04	0,71
C.albicans	от $1x10^6$до $5x10^6$	40	6,15	0,03	0,47
C.glabrata		40	6,23	0,04	0,66
C.krusei		40	6,13	0,02	0,36
C.parapsilosis, C.tropicalis		40	6,52	0,02	0,37

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

Таблица 5

Правильность

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 6

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

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»		Результаты применения референтного метода[4]							
			C.albicans		*C.glabrata*		*C.krusei*		*C.parapsilosis, C.tropicalis*	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	Всего исследовано 700 образцов	положительных	330	0	160	0	120	0	116	0
		отрицательных	0	370	0	540	0	580	0	584

Были использованы 700 образцов отделяемого слизистой оболочки влагалища, полученных от женщин с жалобами на выделения, зуд и жжение во влагалище.

Таблица 7

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность[5] (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %				Диагностическая специфичность[6], (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %			
	C.albicans	*C.glabrata*	*C.krusei*	*C.parapsilosis, C.tropicalis*	*C.albicans*	*C.glabrata*	*C.krusei*	*C.parapsilosis, C.tropicalis*
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	99,1	98,1	97,5	97,5	99,2	99,4	99,5	99,5

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями

[4] В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-FL» (РУ № ФСР 2012/14005).
[5] Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.
[6] Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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

паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, 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[7]. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

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

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

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – Safety data sheet) доступны по запросу.

<u>Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:</u>

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

<u>Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:</u>

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

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

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

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

6. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплектом» FRT-100 FN:
   а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – для приготовления реакционной смеси.
   б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
   в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.), США или аналогичные).

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

8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.), США или аналогичные).
9. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
10. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
11. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие рекомендованные Производителем).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Мазки (соскобы) со слизистой оболочки влагалища

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

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

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

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы отделяемого слизистой оболочки влагалища не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» и другие рекомендованные Производителем. Порядок работы с комплектом реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» смотрите в инструкции к используемому комплекту для экстракции.

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

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

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

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

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

Объем элюции – **100 мкл**.

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

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

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

СОСТАВ

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь Флороскрин-Кандиды раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

экстракции из исследуемых образцов.

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

4. Поставить контрольные реакции:
   а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К1 complex**.
   б) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.
   в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

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

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

Таблица 8

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[9] и планшетного[10] типа

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

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

[8] Программы амплификации (табл. 8, 9) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.
[9] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
[10] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

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

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

	Приборы роторного типа[9]			**Приборы планшетного типа[10]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE**, **ROX**, **Cy5**, **Cy5.5**.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

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

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

Таблица 10

Канал для флуорофора	**FAM**	**JOE**	**ROX**	**Cy5**	**Cy5.5**
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *C.albicans*	ДНК *C.glabrata*	ДНК *C.krusei*	ДНК *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*	ДНК ВКО-FL

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

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

На основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

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

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

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение *Ct* по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не определены. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не выявлена	Значение *Ct* для ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение *Ct* меньше граничного. Результат выдается как **ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не выявлена**.
менее $2x10^2$ ГЭ/мл	ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат менее $2x10^2$ ГЭ/мл**.
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл.**
более $2x10^7$ ГЭ/мл	ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного

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

	диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат более 2x10^7 ГЭ/мл**.

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

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

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

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

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

где:

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

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

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

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

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК)
   а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
   б) по каналу для флуорофора Cy5.5 значение порогового цикла (*Ct)* отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
3. Для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

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

4. Для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

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

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

СОСТАВ

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

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

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

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

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

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

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

7. Поставить контрольные реакции:
   а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К1 complex**.
   б) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.
   в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

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

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

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

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

Таблица 13

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[12] и планшетного[13] типа

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

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

Таблица 14

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

	Приборы роторного типа[12]			**Приборы планшетного типа[13]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE**, **ROX**, **Cy5, Cy5.5**.

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

[12] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
[13] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

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

В. Анализ и интерпретация результатов

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

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

Таблица 15

Канал для флуорофора	**FAM**	**JOE**	**ROX**	**Cy5**	**Cy5.5**
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *C.albicans*	ДНК *C.glabrata*	ДНК *C.krusei*	ДНК *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*	ДНК ВКО-FL

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

На основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

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

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

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

Таблица 16

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение *Ct* по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не определены. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не выявлена	Значение *Ct* для ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение *Ct* меньше граничного. Результат выдается как **ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не выявлена**.
менее $2x10^2$ ГЭ/мл	ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат менее $2x10^2$ ГЭ/мл**.
X x 10^y ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации X x 10^y ГЭ/мл.**
более $2x10^7$ ГЭ/мл	ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат более $2x10^7$ ГЭ/мл**.

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

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

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

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

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

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

число ГЭ *Candida* в 1 мл / число ГЭ ДНК человека в 1 мл	**x 10^5 =**	**число ГЭ *Candida* на 10^5 клеток человека**

где:

– «число ГЭ *Candida* в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *Candida* в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»;

– «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

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

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

Таблица 17

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК)

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

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

исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

б) по каналу для флуорофора Cy5.5 значение порогового цикла (*Ct)* отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

2. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
3. Для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 17). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
4. Для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 17) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

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

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

СОСТАВ

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

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

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

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

A. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

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

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

3. Поставить контрольные реакции:
   а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл К1 complex**.
   б) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл К2 complex**.
   в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

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

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

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

Таблица 18

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[15] и планшетного[16] типа

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

[14] Программы амплификации (табл. 18, 19) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.
[15] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
[16] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

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

Таблица 19

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

	Приборы роторного типа[15]			**Приборы планшетного типа[16]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE**, **ROX**, **Cy5**, **Cy5.5**.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

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

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

Таблица 20

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

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *C.albicans*	ДНК *C.glabrata*	ДНК *C.krusei*	ДНК *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*	ДНК ВКО-FL

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

На основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

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

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

Таблица 21

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Значение	Расшифровка
Невалидный	Значение *Ct* по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не определены. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не выявлена	Значение *Ct* для ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение *Ct* меньше граничного. Результат выдается как **ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* не выявлена**.
менее $2x10^2$ ГЭ/мл	ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат менее $2x10^2$ ГЭ/мл**.
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* (ГЭ/мл) находится в пределах

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

	линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации X x 10^y ГЭ/мл**.
более 2x10^7 ГЭ/мл	ДНК *C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis* выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат более 2x10^7 ГЭ/мл**.

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

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

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

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

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

где:

– «число ГЭ *Candida* в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *Candida* в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»;

– «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

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

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

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

Таблица 22

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

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

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

и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.

3. Для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 22). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
4. Для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 22) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности Е при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

Хранение.

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

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

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

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио» (111394 г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2) в отдел по работе с рекламациями (тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется

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

направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
LOT	Код партии		Использовать до
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
VER	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		Беречь от влаги
	Хрупкое. Осторожно		Верх

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

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
Общества с ограниченной
ответственностью «НекстБио»
_____О. О. Лавинюков
«26» августа 2020 г.

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов

версия 1.0

к наборам реагентов
«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»,
«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»,
«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»,
«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»
(для «ПЦР-комплект» вариант FRT-100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100FN и «ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

АмплиПрайм®

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

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП РАБОТЫ 3
УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 4
ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5
ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 10
СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ 12

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

Обозначения контрольных образцов:

Тип контрольного образца	Возможные обозначения (регистр любой)
ДНК-калибраторы	РУС: К1, К2 ЛАТ: K1, K2
Контрольные образцы	РУС: К+, К-, ПК БВ-, ПК БВ+ ЛАТ: K+, K-, PKO BV-, PKO BV+
Отрицательный контроль экстракции	РУС: В- или ОКО ЛАТ: B- или OKO

НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение версии 1.0 (далее ПО1.0) предназначено для проведения автоматической обработки исходных данных и получения формализованных результатов при использовании наборов реагентов **«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»**[1], **«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»**[2], **«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»**[3] и **«АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»**[4] (для «ПЦР-комплект» вариант FRT-100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100FN и «ПЦР-комплект» вариант FRT-L).

ПО1.0 позволяет проводить автоматическую обработку исходных данных и получение формализованных результатов как при проведении постановки для каждого набора в отдельности, так и в комплексе.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Работа ПО1.0 осуществляется при использовании программы Microsoft Excel системы Office, требования к которой приведены на официальном сайте http://technet.microsoft.com/ru-ru/library/ee624351.aspx

Программа Microsoft Excel использует встроенный язык Visual Basic.

---

[1] Набор реагентов для определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

[2] Набор реагентов для определения ДНК *Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae, Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий (*Bacteria*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

[3] Набор реагентов для определения ДНК грибов рода *Candida* (*C.albicans, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis* и *C.tropicalis*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

[4] Набор реагентов для определения ДНК *Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

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

В качестве исходных данных ПО1.0 использует значения пороговых циклов амплификации (Ct), полученные в программном обеспечении прибора для исследуемых образцов, контролей и калибраторов по пяти соответствующим каналам детекции.

Для начала работы скопировать соответствующие данные из программного обеспечения прибора и вставить в соответствующие столбцы «Данные прибора».

Также для проведения корректного расчета в столбце «Обозначение образца» должны быть соответствующим образом подписаны контрольные образцы (см. таблицу «Обозначения контрольных образцов»).

По окончанию размещения исходных данных и их обозначения произвести расчет путем нажатия кнопки «Рассчитать».

ПО1.0, используя исходные данные, проводит автоматическое построение калибровочных линий и расчет концентрации ДНК микроорганизмов. Программа автоматически проводит сверку полученных значений контрольных образцов с заданным диапазоном согласно инструкции к набору реагентов.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для автоматической обработки исходных данных и получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие условия:

1) Заполнение таблицы «Данные с прибора» должно проводиться без ошибок, с соответствующим обозначением контрольных образцов.
2) Поле «Вкладыш к набору реагентов» должно быть заполнено в строгом соответствии с вкладышем к используемой серии набора реагентов.
3) Необходимо убедиться, что система безопасности Microsoft Excel позволяет использовать макросы. В меню Сервис>Макрос>Безопасность установите «Средний уровень защиты».

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

ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

ПО1.0 и руководство оператора по применению представлены пользователю на диске (оптическом носителе – mini CD).

Внешний вид:

Параметры

Параметры	
Информация о постановке	
Дата постановки	
Оператор ПЦР	
Серия mix-1	
Серия калибраторов	
Прибор	
Учет результатов	

Вкладыш к набору реагентов

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

Вкладыш к набору реагентов				
	FAM/ Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/ Orange	Cy5/ Red
Граничные значения концентраций для контроля "ОК"				
Граничные значения концентраций для контроля "К-"				
Граничные значения Ct для калибратора "К1"				
Граничные значения Ct для калибратора "К2"				
Граничные значения Ct для ВКО образцов и контроля "ОК"				

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

Вкладыш к набору реагентов				
	FAM/ Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/ Orange	Cy5/ Red
Граничные значения концентраций для контроля "ОК"				
Граничные значения концентраций для контроля "К-"				
Граничные значения Ct для калибратора "К1"				
Граничные значения Ct для калибратора "К2"				

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Вкладыш к набору реагентов					
	FAM/ Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/ Orange	Cy5/ Red	Quasar705 Crimson
Граничные значения Ct для контроля "ОК"					
Граничные значения Ct для контроля "К-"					
Граничные значения Ct для калибратора "К1"					
Граничные значения Ct для калибратора "К2"					
Граничные значения Ct для ВКО образцов					

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

Вкладыш к набору реагентов				
	FAM/ Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/ Orange	Cy5/ Red
Граничные значения Ct для контроля "ОК"				
Граничные значения Ct для контроля "К-"				
Граничные значения Ct для калибратора "К1"				
Граничные значения Ct для калибратора "К2"				
Граничные значения Ct для ВКО образцов				

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

Калибровка

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

Калибровка		
Результаты калибровки		
FAM/ Green **Энтеробактерии**	*JOE/HEX/ Yellow* **Стафилококки**	*ROX/ Orange* **Стрептококки**
Эффективность E (N: 0,8-1,2)		
Статус калибровки		

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

Калибровка			
Результаты калибровки			
FAM/ Green **Gv**	*JOE/HEX/ Yellow* **Av**	*ROX/ Orange* **Lacto**	*Cy5/ Red* **Bact**
Эффективность E (N: 0,8-1,2)			
Статус калибровки			

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Калибровка			
Результаты калибровки			
FAM/ Green **C.a.**	*JOE/HEX/ Yellow* **C.g.**	*ROX/ Orange* **C.k.**	*Cy5/ Red* **C.p., C.t.**
Эффективность E (N: 0,8- 1,2)			
Статус калибровки			

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

Калибровка			
Результаты калибровки			
FAM/ Green **UP**	*JOE/HEX/ Yellow* **UU**	*ROX/ Orange* **MH**	*Cy5/ Red* **ВКО**
Эффективность E (N: 0,8- 1,2)			
Статус калибровки			

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

Данные прибора

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» (при использовании четырех наборов одновременно).

Данные прибора

№	Обозначение образца	Порог. циклы				
		FAM/ Green	*JOE/HEX/ Yellow*	*ROX/ Orange*	*Cy5/ Red*	*Quasar705 Crimson*
		CT	CT	CT	CT	CT
1						
2						
3						
4						
5						
6						

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

Данные прибора

№	Обозначение образца	Порог. циклы			
		FAM/ Green Энтеробакт.	*JOE/HEX/ Yellow* Стафилококки	*ROX/ Orange* Стрептококки	*Cy5/ Red* ВКО
		CT	CT	CT	CT
1					
2					
3					
4					
5					
6					

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

Данные прибора

№	Обозначение образца	Порог. циклы			
		FAM/ Green Gv	*JOE/HEX/ Yellow* Av	*ROX/ Orange* Lacto	*Cy5/ Red* Bact
		CT	CT	CT	CT
1					
2					
3					
4					
5					
6					

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

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Данные прибора						
№	Обозначение образца	Порог. циклы				
		FAM/ Green C.albicans	JOE/HEX/ Yellow C.glabrata	ROX/ Orange C.krusei	Cy5/ Red C.p., C.t.	Quasar705 Crimson ВКО
		CT	CT	CT	CT	CT
1						
2						
3						
4						
5						
6						

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

Данные прибора					
№	Об-е образца	Порог. циклы			
		FAM/ Green UP	JOE/HEX/ Yellow UU	ROX/ Orange MH	Cy5/ Red ВКО
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Результаты

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» (при использовании четырех наборов одновременно).

Результаты																
Кандиды				Бактериальный вагиноз				Аэробы			Микоплазмы			ДНК человека	Результат
FAM/ Green C.albicans	JOE/HEX/ Yellow C.glabrata	ROX/ Orange C.krusei	Cy5/ Red C.p., C.t.	FAM/ Green Gv	JOE/HEX/ Yellow Av	ROX/ Orange Lacto	Cy5/ Red Bact	FAM/ Green Энтеробакт.	JOE/HEX/ Yellow Стафилококки	ROX/ Orange Стрептококки	FAM/ Green UP	JOE/HEX/ Yellow UU	ROX/ Orange MH		
CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

Результаты

Концентрации (копии/мл)			Концентрации (ГЭ/мл)			Результат			
FAM/ Green Энтеробакт.	JOE/HEX/ Yellow Стафилококки	ROX/ Orange Стрептококки	FAM/ Green Энтеробактерии	JOE/HEX/ Yellow Стафилококк	ROX/ Orange Стрептококки	Энтеробактерии	Стафилококки	Стрептококки	статус
копии/мл	копии/мл	копии/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

Результаты

Концентрации				Коэфф-ты			Результат		
FAM/ Green Gv	JOE/HEX/ Yellow Av	ROX/ Orange Lacto	Cy5/ Red Bact	КС1	КС2	КС3	статус	результат	расшифровка
ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл						

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Результаты

Концентрации (копий ДНК/мл)				Результат		
FAM/ Green C.albicans	JOE/HEX/ Yellow C.glabrata	ROX/ Orange C.krusei	Cy5/ Red C.p., C.t.	результат	статус	расшифровка
ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл			

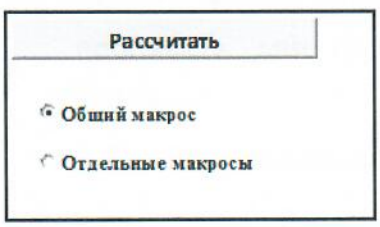
– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

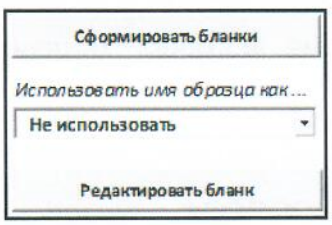
Результаты

Концентрации (ГЭ/мл)				Концентрации (ГЭ/10^5 клеток)			Результат		
FAM/ Green UP	JOE/HEX/ Yellow UU	ROX/ Orange MH	Cy5/ Red ВКО	FAM/ Green UP	JOE/HEX/ Yellow UU	ROX/ Orange MH	кол-во клеток в мл	результат	статус

Кнопки управления

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» (при использовании четырех наборов одновременно).







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

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

Рассчитать

Очистить

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

Рассчитать

Очистить

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Рассчитать

Очистить

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

Рассчитать

Очистить

ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Проверить, что система безопасности Microsoft Excel позволяет использовать макросы.

   Для Microsoft Excel 2003 следует выполнить следующие действия: во вкладке Меню выбрать «Сервис» > «Макрос» > «Безопасность» и установить Средний уровень защиты.
2. Открыть файл с ПО1.0, принять включение макросов.
3. Заполнить таблицу «Граничные значения порогового цикла (Ct)» путем копирования данных непосредственно из программного обеспечения прибора, либо из файла экспорта данных в Microsoft Excel. Значения пороговых циклов прописать для соответствующих каналов амплификации, приведенных в таблице.

   3.1. При проведении постановки с использованием одного, двух или трёх наборов реагентов серии ФЛОРОСКРИН® необходимо внести полученные значения Ct для каждого набора реагентов на лист

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

Microsoft Excel с названием, соответствующем требуемому набору реагентов.

3.2. При проведении постановки с использованием четырех наборов реагентов серии ФЛОРОСКРИН® одновременно необходимо внести полученные значения Ct для каждого набора реагентов на лист Microsoft Excel с названием «ФЛОРОСКРИН®».

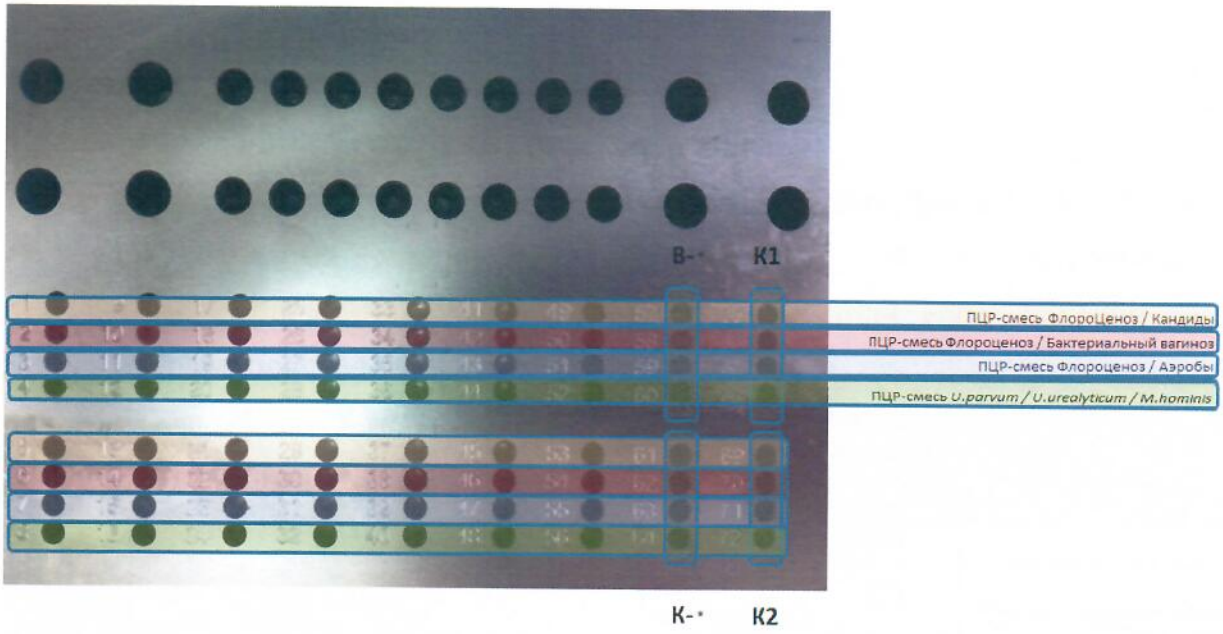
4. Внести или вставить обозначения исследуемых образцов в столбец «Обозначение образца» поля «Данные прибора».
5. Обозначить контрольные образцы в соответствии с табл. «Обозначения контрольных образцов». Язык и регистр букв значения не имеет.
6. Ввести информацию о постановке в соответствующем поле.
7. Сохранить файл под другим именем.
8. В случае, если необходимо провести комплексный анализ результатов по всем используемым наборам реагентов, проверить, что активирована опция «Общий макрос» и нажать «Рассчитать».
9. Если необходимо получить раздельный результат по каждому используемому набору реагентов, нажать клавишу «Рассчитать» на соответствующих листах программы.

   В файле будут отражены полученные калибровочные линии, расчетные концентрации, результаты (статус образцов, результат, расшифровка).
10. Проверить, что калибровка проведена успешно: в столбцах «Статус калибровки» на всех листах появится надпись «ОК», эффективность находится в диапазоне от 0.8 до 1.2.
11. Просмотреть статус образцов, особое внимание обратить на контрольные образцы.

ВНИМАНИЕ! Программное обеспечение автоматически проверяет наличие контрольных образцов и калибраторов в постановке. В случае отсутствия калибратора К1 и сохраненных данных предыдущей калибровки, анализ постановки и расчет результатов проводиться не будут.

Важно! При использовании комплексного анализа ФЛОРОСКРИН® (одновременное исследование четырех наборов реагентов) раскапку реакционных смесей и образцов следует проводить следующим образом:

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

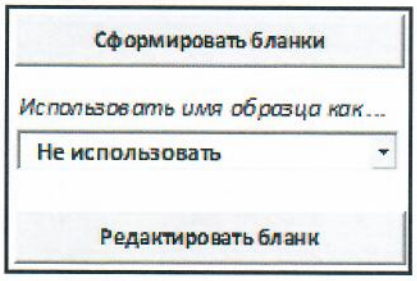


* - не обязательные контроли

Положение калибраторов не имеет значения, внесение калибраторов производится аналогично внесению исследуемых образцов во все используемые реакционные смеси.

Изменять порядок раскапки ПЦР-смесей нельзя!

При использовании комплексного исследования ФЛОРОСКРИН® возможно формирование бланков заключений напрямую из макроса. Для этого после анализа данных и вывода заключений в лист Microsoft Excel с названием «ФЛОРОСКРИН®» необходимо нажать кнопку «Сформировать бланки». При необходимости возможно редактирование бланков до формирования (кнопка «Редактировать бланк»).



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

СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

Результаты

Результаты анализа выдаются в следующем виде:

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды», «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» (при использовании четырех наборов одновременно).

Результаты

Кандиды				Бактериальный вагиноз				Аэробы			Микоплазмы			ДНК человека	Результат
FAM/ Green C.albicans	JOE/HEX/ Yellow C.glabrata	ROX/ Orange C.krusei	Cy5/ Red C.p., C.t.	FAM/ Green Gv	JOE/HEX/ Yellow Av	ROX/ Orange Lacto	Cy5/ Red Bact	FAM/ Green Энтеробакт	JOE/HEX/ Yellow Стафилококки	ROX/ Orange Стрептококки	FAM/ Green UP	JOE/HEX/ Yellow UU	ROX/ Orange MH		
				8,E+08		1,E+08	5,E+08							0,E+00	Сбой - Кандиды, Аэробы, Микоплазмы
1,E+05				8,E+08		1,E+08	5,E+08	5,E+02	1,E+03		2,E+04			7,E+06	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу. Концентрация Candida albicans превышает 10^2ГЭ/мл
				2,E+08	1,E-07	2,E+08	2,E+08	7,E+02	5,E+04	8,E+05	2,E+06			2,E+06	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу. Концентрация Ureaplasma parvum превышает 10^5ГЭ/мл

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

Результаты

Концентрации (копии/мл)			Концентрации (ГЭ/мл)			Результат			
FAM/ Green Энтеробакт.	JOE/HEX/ Yellow Стафилококки	ROX/ Orange Стрептококки	FAM/ Green Энтеробактерии	JOE/HEX/ Yellow Стафилококк	ROX/ Orange Стрептококки	Энтеробактерии	Стафилококки	Стрептококки	статус
копии/мл	копии/мл	копии/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	
0,E+00	0,E+00	0,E+00	0,E+00	0,E+00	0,E+00	-	-	-	Невалидный
1,E+03	3,E+03	0,E+00	5,E+02	1,E+03	0,E+00	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Ok
2,E+03	1,E+05	2,E+06	7,E+02	5,E+04	8,E+05	Не обнаружено	5,E+04	8,E+05	Ok
1,E+03	3,E+03	0,E+00	5,E+02	1,E+03	0,E+00	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Ok
4,E+03	1,E+05	3,E+05	1,E+03	6,E+04	1,E+05	Не обнаружено	6,E+04	1,E+05	Ok

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

Результаты

Концентрации				Коэфф-ты			Результат		
FAM/ Green Gv	JOE/HEX/ Yellow Av	ROX/ Orange Lacto	Cy5/ Red Bact	KC1	KC2	KC3	статус	результат	расшифровка
ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл						
8,E+08		1,E+08	5,E+08	-0,8	0,6	-0,2	Ok	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу.	Количество G.vaginalis и/или A.vaginae практически равно или превышает количество Lactobacillus spp
8,E+08		1,E+08	5,E+08	-0,8	0,6	-0,2	Ok	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу.	Количество G.vaginalis и/или A.vaginae практически равно или превышает количество Lactobacillus spp
2,E+08	1,E+07	2,E+08	2,E+08	0,1	0,0	0,0	Ok	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу.	Количество G.vaginalis и/или A.vaginae практически равно или превышает количество Lactobacillus spp

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Результаты

Концентрации (копий ДНК/мл)				Результат		
FAM/ Green C.albicans	JOE/HEX/ Yellow C.glabrata	ROX/ Orange C.krusei	Cy5/ Red C.p., C.t.	результат	статус	расшифровка
ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл	ГЭ/мл			
					Невалидный	Невалидный результат. Ct по ВКО превышает граничное значение.
1,E+05				ДНК_C.albicans	Ok	Обнаружена: ДНК C.albicans
				Не обнаружено	Ok	Не обнаружена ДНК анализируемых видов
4,E+00				Не обнаружено	Ok	Не обнаружена ДНК анализируемых видов
				Не обнаружено	Ok	Не обнаружена ДНК анализируемых видов
				Не обнаружено	Ok	Не обнаружена ДНК анализируемых видов

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

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

Результаты

Концентрации (ГЭ/мл)				Концентрации (ГЭ/10^5 клеток)			Результат		
FAM/ Green **UP**	*JOE/HEX/ Yellow* **UU**	*ROX/ Orange* **MH**	*Cy5/ Red* **BKO**	*FAM/ Green* **UP**	*JOE/HEX/ Yellow* **UU**	*ROX/ Orange* **MH**	*кол-во клеток в мл*	*результат*	*статус*
							0,E+00		<50 000 клеток человека в мл
2,E+04			7,E+06	3,E+02			7,E+06	U.parvum	Ok
2,E+06			2,E+06	8,E+04			2,E+06	U.parvum	Ok
9,E+06		4,E+07	5,E+06	2,E+05		8,E+05	5,E+06	U.parvum M.hominis	Ok
3,E+03		9,E+03	8,E+06	4,E+01		1,E+02	8,E+06	U.parvum M.hominis	Ok

В столбце «статус» выводятся сообщения об успешности проведения анализа для данного образца. В случае, если образец не укладывается в заданные критерии валидности, его статус выдается как «Невалидный». В случае получения статуса «Невалидный», необходим повторный анализ данного образца. В случае плохого взятия биологического материала с низким содержанием клеток человека, результат выдается как «<50 000 клеток человека в мл», в этом случае необходим повторный забор биологического материала для проведения исследования.

В столбце «Концентрация (ГЭ ДНК/мл)» выводятся количественные результаты для каждого выявляемого возбудителя. В случае, если для образца получен результат более или менее линейного диапазона измерения, количественные данные представляются в виде «> линейного диапазона» и «< линейного диапазона» соответственно. В случае отсутствия возбудителя в образце соответствующее поле в таблице результатов остается пустым.

Интерпретация контрольных образцов.

В случае успешного прохождения контрольных образцов, в столбце статус выдается сообщение «Ок». Если контрольный образец не укладывается в заданные критерии, статус меняется на «Сбой!».

При проведении количественного анализа дополнительно проверяются параметры построения калибровочных прямых по каждому каналу флуоресцентной детекции. Статус калибровки «Ок» соответствует успешному построению калибровочной прямой, статус «Сбой!» означает, что калибровочная прямая не может быть построена по данному каналу, возможен только качественный анализ результатов.

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

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Аэробы»

Калибровка

Результаты калибровки		
FAM/ Green **Энтеробактерии**	*JOE/HEX/ Yellow* **Стафилококки**	*ROX/ Orange* **Стрептококки**
Эффективность E (N: 0,8-1,2)		
0,963	0,936	0,951
Статус калибровки		
Ok	**Ok**	**Ok**

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз»

Калибровка

Результаты калибровки			
FAM/ Green **Gv**	*JOE/HEX/ Yellow* **Av**	*ROX/ Orange* **Lacto**	*Cy5/ Red* **Bact**
Эффективность E (N: 0,8-1,2)			
0,995	0,920	1,013	0,933
Статус калибровки			
Ok	**Ok**	**Ok**	**Ok**

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Кандиды»

Калибровка

Результаты калибровки			
FAM/ Green **C.a.**	*JOE/HEX/ Yellow* **C.g.**	*ROX/ Orange* **C.k.**	*Cy5/ Red* **C.p., C.t.**
Эффективность E (N: 0,8- 1,2)			
0,892	0,846	0,974	0,887
Статус калибровки			
Ok	**Ok**	**Ok**	**Ok**

– «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы»

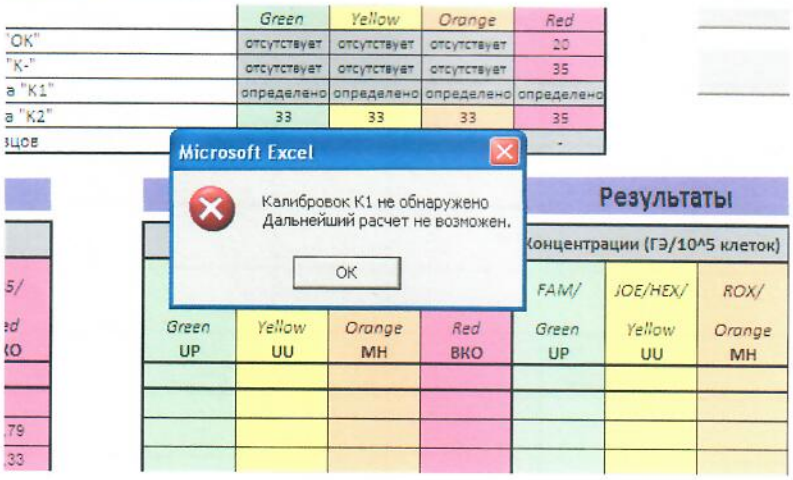
Калибровка

Результаты калибровки			
FAM/ Green **UP**	*JOE/HEX/ Yellow* **UU**	*ROX/ Orange* **MH**	*Cy5/ Red* **BKO**
Эффективность E (N: 0,8- 1,2)			
0,945	0,936	0,984	0,945
Статус калибровки			
Ok	**Ok**	**Ok**	**Ok**

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

Дополнительные сообщения

В случае если данных для количественного расчета постановки недостаточно (например, отсутствуют калибраторы), программное обеспечение выдает следующие сообщение:



Дальнейший расчет не возможен.

Лист регистрации изменений

Изм.	Номера листов				Всего листов в документе	Номер извещения об изменении	Измене-ния внес	Дата
	изменённ ых	заменён-ных	новых	аннулиро-ванных				
1	–	1,3,5 – 15	1	–	17	09286667.022.4 /6-2020	Колачевск ий Н.Н.	26.08.2020

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

Пронумеровано, скреплено и прошито
17 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «НекстБио»

О.О. Лавинюков

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