

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФГБУ "Государственный научный
центр дерматовенерологии и
косметологии"
(ФГБУ ГНЦДК Минздрава России)

ОРГАНИЗАЦИЯ-РАЗРАБОТЧИК

ФГБОУ ВО «Северо-Западный
государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова»
(ФГБОУ ВО СЗГМУ
им. И.И. Мечникова Минздрава
России)

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ ГНЦДК

_____ А.А. Кубанов
Дата издания «__» _____ 20__ г.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И.
Мечникова

_____ С.А. Сайганов
Дата издания «__» _____ 20__ г.



Микоцентр

Набор реагентов для выявления и видовой идентификации основных возбудителей инвазивного кандидоза (ИК): *Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) и *C. auris* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«Микоцентр кандиды-тест»

ТУ 21.20.23-001-30625447-2023

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России
РФ, МО, Сергиево-Посадский городской округ,
п. Зеленая Дубрава



ОГЛАВЛЕНИЕ

	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
1.	НАЗНАЧЕНИЕ	5
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	7
2.1.	Принцип метода	7
2.2.	Форма выпуска, состав и комплектность	8
2.3.	Техническое обслуживание и ремонт	11
3.	КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	11
3.1.	Внутренний контроль качества	11
3.1.1.	Отрицательный и положительный контроли исследования	12
3.1.2.	Контроль ингибирования	12
3.1.3.	Мониторинг лаборатории на наличие контаминации	12
4.	ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	13
5.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	13
6.	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	17
7.	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	19
7.1	Материал для исследования	19
7.2.	Взятие материала на исследование	19
7.3.	Транспортирование и хранение исследуемых образцов	20
7.4.	Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК	21
8.	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	22
8.1.	Выделение ДНК из исследуемого материала	22
8.2.	Подготовка компонентов набора и постановка реакции	23
8.3.	Анализ и интерпретация результатов	25
9.	ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	29
9.1.	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)	29
9.2	Аналитическая специфичность	32
9.3	Воспроизводимость и повторяемость измерения	32
9.4.	Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	34
9.5.	Оценка влияния интерферирующих веществ	35
9.6.	Оценка прослеживаемости значений положительных контрольных образцов	36
10.	СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	38
11.	ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	38
12.	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	39
13.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	41
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ ТРАНСПОРТНОЙ ТАРЫ	41
15	Перечень применяемых производителем МИ национальных стандартов	42
	ЛИТЕРАТУРНЫЕ ССЫЛКИ	44

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

Сt	- Cycle threshold (пороговый цикл)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ИК	- инвазивный кандидоз
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец ПЦР
К-	- отрицательный контроль экстракции
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
НК	- нуклеиновые кислоты

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и видовой идентификации основных возбудителей инвазивного кандидоза (ИК): *Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) и *C. auris* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Микоцентр кандида-тест» ТУ 21.20.23-001-30625447-2023 (далее – набор реагентов)

Краткое наименование: Набор реагентов «Микоцентр кандида-тест».

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Микоцентр кандида-тест» предназначен для качественного выявления и дифференциации ДНК грибов рода *Candida*, основных возбудителей инвазивного кандидоза (ИК): *Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) и *C. auris* в образцах (препаратах), полученных из стерильных в норме субстратов человека (кровь, перитонеальная (асцитическая) жидкость) и в образцах из культур, в том числе подращённых гемокультур, возбудителей кандидоза методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

За последние два десятилетия инфекционные заболевания, обусловленные микроскопическими грибами, стали важной проблемой здравоохранения. Миллионы людей (более 300 млн.) страдают тяжелыми острыми или хроническими грибковыми инфекциями [1-5]. Внедрение в практику новых медицинских технологий (трансплантации органов и тканей, высокодозной цитостатической и иммуносупрессивной терапии и пр.) наряду с пандемией ВИЧ/СПИД и COVID-19 привело к увеличению частоты микотических поражений, при этом инвазивные микозы характеризуются тяжестью клинических проявлений и очень высокой летальностью. По данным Всемирного фонда борьбы с грибковыми инфекциями (GAFFI) инвазивные грибковые инфекции являются причиной более 1,5 миллионов летальных исходов в год [6-8], что сопоставимо с летальностью от туберкулеза и в четыре раза превышает летальность от малярии. Проблему усугубляет новый фактор развития инвазивных микозов – COVID-19. Установлено, что у больных тяжелой формой COVID-19 на фоне выраженного нарушения местного и системного иммунитета, обусловленного как самой вирусной инфекцией, так и применением глюкокортикостероидов и иммуносупрессоров, могут также возникать тяжелые грибковые инфекции (инвазивный кандидоз, аспергиллез, мукомикоз).

Наиболее частыми возбудителями грибковых инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются грибы рода *Candida*. Инвазивный кандидоз (ИК) – самый распространенный внутрибольничный микоз. Ежегодно в мире регистрируется более 400000 случаев ИК. Распространенность ИК составляет от 2,4 – 29 / 100000 населения в год. По данным многоцентровых исследований, частота развития ИК в стационарах различных стран составляет от 0,33 до 24 случаев на 1000 госпитализированных. В Российской Федерации внутрибольничный ИК в многопрофильном стационаре встречается с частотой 0,3 на 1000 госпитализированных больных, в отделениях реанимации и интенсивной терапии – 2,6 на 1000 [9-11].

Методы идентификации на основе культуральных технологий до недавних пор были золотым стандартом диагностики грибковой инфекции, но, к сожалению, требуют не только много времени и трудозатрат, но и допускают ошибочную идентификацию. Проблемы в диагностике инфекций кровотока в ОРИТ и ХОРИТ приводят к необоснованному применению антибиотиков (вместо антимикотиков) у больных ИК, что способствует не только высокой летальности при инвазивных микозах, но и нарастанию бремени антибактериальной резистентности [12].

В настоящее время молекулярные технологии, такие как ИФА и ПЦР в реальном времени (с коротким временем проведения анализа), представляют альтернативные методы культуральной диагностики микотической инфекции.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов/комплектов реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР:

- комплект реагентов для экстракции ДНК «МАГНО-сорб», форма 4 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) при работе с кровью, перитонеальной (асцитической) жидкостью, культурами грибов – возбудителей ИК. Рекомендован только ручной метод выделения. Не рекомендуется использовать автоматические станции пробоподготовки из-за кратного снижения чувствительности (предела обнаружения) набора реагентов;
- набор для выделения ДНК бактерий и грибов из культур микроорганизмов «ПРОБА-КМ» (ООО «ДНК-Технология») при работе с подращёнными гемокультурами возбудителей кандидоза.

Область применения: Медицинская микробиология. Клиническая лабораторная диагностика. Набор может быть использован в клиничко-диагностических, микробиологических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявления и дифференциации ДНК грибов рода *Candida*, основных возбудителей ИК: *Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) и *C. auris* в биологическом материале человека и в образцах из культур микроорганизмов - потенциальных возбудителей кандидоза методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Показания к проведению анализа: подозрение на диссеминированный кандидоз, кандидемию; исследование культур дрожжевых грибов (в том числе подращённых гемокультур) с целью видовой идентификации.

Исследование применимо как для анализа клинического материала из предполагаемого очага инфекции, так и для предварительно выращенных на жидких и плотных средах культур возбудителей микозов.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования должен интерпретировать врач (клинический миколог, инфекционист) с учетом клинических данных пациента и результатов других исследований.

Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов.

Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методами молекулярно-генетической диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

Набор реагентов применяется с программируемыми амплификаторами с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» планшетного типа, зарегистрированными в Российской Федерации, с наличием независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5 (например, «CFX96» (Bio-Rad, США)).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 60 образцов, включая контрольные образцы.

Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Принцип метода основан на процессе амплификации выбранного специфического фрагмента ДНК с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с применением флуоресцентных зондов Taq-Man, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров и зонда на комплементарные последовательности ДНК, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой. При гибридизации флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов) с участком ДНК-мишени флуоресцентный краситель,

содержащийся на 5'-конце зонда, отщепляется в реакционную смесь, разобщаясь с гасителем, расположенным на 3'-конце, что приводит к возрастанию уровня интенсивности флуоресцентного сигнала, которое детектируется с помощью амплификатора с системой детекции флуоресценции в режиме «реального времени».

Мультиплицирование семи фрагментов-мишеней ДНК изучаемых грибов рода *Candida* в двух пробирках (ПЦР смесь I и II) происходит за счет использования флуоресцентно-меченых зондов с не пересекаемыми спектральными зонами: FAM, VIC, ROX, Cy5 и Cy5.5, что позволяет сократить количество постановок ПЦР, поскольку появляется возможность одновременной регистрации результатов разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Таблица 1

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции для ПЦР смесей I и II

№ ПЦР-смеси	Канал детекции флуорофора	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5
I	ДНК-мишень	ДНК <i>C. auris</i>	ДНК <i>C. guilliermondii</i>	ДНК <i>C. glabrata</i>	ДНК <i>C. tropicalis</i>	ДНК человека
	Область амплификации	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	ген <i>Glob</i>
II	ДНК-мишень	ДНК <i>C. parapsilosis</i>	ДНК <i>C. albicans</i>	ДНК <i>C. krusei</i>	ДНК гриба	-
	Область амплификации	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>5.8S</i>	

Кроме видоспецифичных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, необходимых для видовой идентификации, в реакции используются олигонуклеотидные последовательности специфичные для гена β-глобина человека *Glob* – в качестве эндогенного контроля реакции при работе с биосубстратами, содержащими клетки человека, и пан-грибковая конструкция, которая работает и как эндогенный контроль реакции при работе с культурами дрожжевых грибов, и как маркер ИК, вызванного другими видами дрожжевых грибов, при анализе клинического материала, что позволяет не использовать дополнительно внутренние контрольные образцы (ВКО).

Полный анализ включает следующие этапы: экстракция (выделение) ДНК из образцов клинического материала, ПЦР-амплификация участков геномов грибов рода *Candida* и гибридационно-флуоресцентная детекция флуоресцентного сигнала, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

2.2. Форма выпуска, состав и комплектность

Форма комплектации предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК основных возбудителей ИК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Набор реагентов выпускается в стандартной фасовке и включает реагенты, указанные в таблице 2. Комплектность поставки указана в таблице 3.

Таблица 2


Реагенты, входящие в набор реагентов


Наименование компонентов	Описание / Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем, мл
ПЦР-смесь-1 <i>Candida auris</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>) / <i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) / <i>C. tropicalis</i>	Раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами / Прозрачная розово-фиолетовая жидкость. Хлопья или осадок отсутствуют.	1	0,90
ПЦР-смесь-2 <i>Candida parapsilosis</i> / <i>C. albicans</i> / <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) / <i>Fungi</i> spp.	Раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами / Прозрачная розово-фиолетовая жидкость. Хлопья или осадок отсутствуют.	1	0,90
Реакционный буфер	Буферный раствор с сульфатом аммония, хлоридом магния и дНТФ / Прозрачная бесцветная жидкость. Хлопья или осадок отсутствуют.	2	1,55
Раствор Taq-полимеразы	Раствор термостабильной ДНК-полимеразы Taq / Прозрачная бесцветная вязкая жидкость. Хлопья или осадок отсутствуют.	1	0,12
ПКО ДНК 1 <i>Candida auris</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>) / <i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) / <i>C. tropicalis</i> / ДНК человека	Положительный контрольный образец для ПЦР смесь I / Прозрачная бесцветная жидкость. Хлопья или осадок отсутствуют.	1	0,3
ПКО ДНК 2 <i>Candida parapsilosis</i> / <i>C. albicans</i> / <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	Положительный контрольный образец для ПЦР смесь II /	1	0,3

	Прозрачная бесцветная жидкость. Хлопья или осадок отсутствуют.		
ОКО	Отрицательный контрольный образец ПЦР / Прозрачная бесцветная жидкость. Хлопья или осадок отсутствуют.	1	0,3

Таблица 3

Комплектность набора реагентов

№ п/п	Компонент	Формат	Количество, шт.
1	ПЦР-смесь-1 <i>Candida auris</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>) / <i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) / <i>C. tropicalis</i> (900 мкл)	Пробирки типа Эппендорф с крышкой объемом 1,5 мл	1
2	ПЦР-смесь-2 <i>Candida parapsilosis</i> / <i>C. albicans</i> / <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) / <i>Fungi spp.</i> (900 мкл)	Пробирки типа Эппендорф с крышкой объемом 1,5 мл	1
3	Реакционный буфер (1550 мкл)	Пробирки типа Эппендорф с крышкой объемом 1,5 мл	2
4	Раствор Таq-полимеразы (120 мкл)	Пробирки типа Эппендорф с крышкой объемом 1,5 мл	1
5	ПКО ДНК 1 <i>Candida auris</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>) / <i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) / <i>C. tropicalis</i> / ДНК человека (300 мкл)	Пробирки типа Эппендорф с крышкой объемом 1,5 мл	1
6	ПКО ДНК 2 <i>Candida parapsilosis</i> / <i>C. albicans</i> / <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) (300 мкл)	Пробирки типа Эппендорф с крышкой объемом 1,5 мл	1
7	ОКО (300 мкл)	Пробирки типа Эппендорф с крышкой объемом 1,5 мл	1
8	Инструкция по применению	в электронном виде на официальном сайте изготовителя https://cnikvi.ru/napravleniya-deyatelnosti/#proizvodstvennaya-deyatelnost 	-
9	Краткое руководство по применению	в бумажном виде	1

10	Вкладыш	в бумажном виде	1
11	Паспорт качества	в бумажном виде и/или на официальном сайте Изготовителя: https://cnikvi.ru/napravleniya-deyatelnosti/#proizvodstvennaya-deyatelnost 	1 / -

Набор реагентов выпускается нестерильным.

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.3. Техническое обслуживание и ремонт

Набор реагентов не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контроль экстракции (К-), который представляет собой 200 мкл очищенной воды (в комплект набора не входит). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательные контрольные образцы (ОКО) для каждой из ПЦР смесей (I и II) и положительные контрольные образцы (ПКО ДНК 1 *Candida auris* / *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) / *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*) / *C. tropicalis* / ДНК человека для ПЦР смеси I и ПКО ДНК 2 *Candida parapsilosis* / *C. albicans* / *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) для ПЦР смеси II). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Анализ и интерпретация результатов».

Отрицательный контроль экстракции (К-) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *C. albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. auris*, а также ДНК других грибов (использование панфунгальных праймеров и зонда, специфичных для региона 5.8S рДНК грибов) и ДНК человека (по гену β-глобина *Glob*). В случае несоответствия результата, полученного для

контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов и контроля, начиная с этапа выделения ДНК.

Отрицательный контрольный образец ПЦР (ОКО) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контрольным образцом не должны детектироваться ДНК *C. albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. auris*, а также ДНК других грибов (использование панфунгальных праймеров и зонда, специфичных для региона 5.8S рДНК грибов) и ДНК человека (по гену β -глобина *Glob*). В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов и контроля, начиная с этапа постановки реакции амплификации.

В качестве положительных контролей ПЦР используются реагенты ПКО ДНК 1 *Candida auris* / *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) / *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*) / *C. tropicalis* / ДНК человека и ПКО ДНК 2 *Candida parapsilosis* / *C. albicans* / *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа постановки реакции амплификации.

3.1.2 Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК (при работе с биологическим материалом человека (кровь) и образцами культур грибов (в том числе гемокультур) и оценки влияния ингибиторов ПЦР в Наборе реагентов предусмотрено использование не только видоспецифичных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, необходимых для видовой идентификации, но и олигонуклеотидных последовательностей специфичных для гена β -глобина человека *Glob* – в качестве эндогенного контроля реакции при работе с биосубстратами, содержащими клетки человека; и пан-грибковых праймеров и зонда в качестве эндогенного контроля реакции при работе с культурами дрожжевых грибов, что позволяет не использовать дополнительно внутренние контрольные образцы (ВКО). Если в исследуемых образцах, отрицательных на наличие ДНК исследуемых

возбудителей микозов, выделенных из крови или из культур грибов, не обнаружен ген β -глобина человека *Glob* (ПЦР смесь I, канал Cy5.5) или фрагмент 5.8S рибосомальной рДНК грибов (ПЦР смесь II, канал Cy5), соответственно, то результаты данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

3.1.3 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, штативов, рабочих поверхностей лабораторной мебели, ламинарных шкафов, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При выявлении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор реагентов применяется только для диагностики *in vitro*. Вид медицинского изделия (в ред. Приказов Минздрава РФ от 25.09.2014 N 557н от 07.07.2020 N 686н): 5.4 Реагенты/наборы для определения аналитов для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор реагентов предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе п.1. «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел п.7. «Анализируемые образцы»).

4.4. Набор реагентов предназначен для профессионального применения. Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики или медицинской микробиологии) персоналом (врачи или биологи клинических лабораторий, медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.5. При работе с набором реагентов следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе п.6. «Оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2б (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

5.2. Работа с набором должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР) биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», организация и архитектурно-планировочное решение помещений которой отвечает методическим указаниям (МУ 1.3.2569-09) «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

5.3. При проведении исследований с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как потенциально инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Для предотвращения контаминации обеспечивать поточность движения исследуемого материала, проб нуклеиновых кислот, продуктов амплификации, разделяя этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

- При исследовании материала, все манипуляции, включая манипуляции, сопровождающиеся риском образования аэрозоля (встряхивание, центрифугирование и т. д.) при обработке материала и выделении нуклеиновых кислот, выполнять в боксах

биологической безопасности II класса. Подготовку к проведению амплификации с использованием набора реагентов проводить в ПЦР-боксах.

- Перенос проб из одной рабочей зоны в другую, а также их хранение в данных помещениях осуществлять в плотно закрывающихся пластмассовых контейнерах (штативах) с их последующей обработкой регламентированными дезинфицирующими средствами после каждого использования.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- При работе с набором следует одевать одноразовые медицинские перчатки.
- Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, поверенных соответствующим образом (в аккредитованных лабораториях), необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими зонами.

- Для проведения реакции амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов. Расходные материалы (наконечники, пробирки и т. д.) должны строго соответствовать используемому оборудованию (автоматическим пипеткам, термоциклерам и т. д.).

- Не допускается использование одних и тех же наконечников при работе с различными образцами биологического материала.

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней») и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Условия хранения набора реагентов и образцов исследуемых биологических проб должно соответствовать инструкции по применению. Образцы проб, содержащих нуклеиновые кислоты и (или) ампликоны хранят отдельно от реагентов в разных холодильниках.

- По окончании работы все объекты, инфицированные (подозрительные на инфицирование) микроорганизмами помещают на хранение в холодильное (морозильное) оборудование на время проведения исследований. Рабочее место и рабочие поверхности оборудования для дезинфекции и предотвращения контаминации обрабатывают регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как «ИНСТРУДЕЗ», «КОМБИДЕЗ», «ЭКОБРИЗ окси», «Экобриз спрей» согласно их

инструкции по применению) и подвергают действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа.

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

- При возникновении контаминации ПЦР продуктами в помещениях лаборатории все работы останавливаются и проводятся мероприятия по устранению контаминации, с последующим внутрилабораторным контролем качества дезинфекции и проведенной деконтаминации ампликонов путем исследования смывов с рабочих поверхностей ламинарных боксов, оборудования, внутренних поверхностей автоматических пипеток/дозаторов и поверхностей помещений (см. п.3.1.3. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации).

- Утилизацию отходов, образующихся при использовании набора (класса А и Б), проводят согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Производитель предпринял все меры для максимального снижения потенциального и косвенного риска применения изделия и условий, в которых данное изделие предназначено для применения, остаточные риски оценены как допустимые.

5.4. Возможные побочные эффекты: при использовании специально обученным персоналом, с учетом применения набора реагентов строго по назначению, при соблюдении требований безопасности при работе с набором реагентов побочные эффекты отсутствуют.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека: при использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

5.5. Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

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

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, вред при вдыхании и

приеме внутрь. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

5.6. Не использовать набор:

- При нарушении условий транспортировки и хранения;
- При несоответствии внешнего вида компонентов, указанного в паспорте к набору;
- При нарушении внутренней упаковки компонента набора;
- По истечению срока годности набора.

5.7 Требования охраны окружающей среды

Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора реагентов не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

Все компоненты набора реагентов нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора реагентов, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

Примечание – Набор реагентов при использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

1. Наборы/комплекты реагентов для выделения ДНК, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР:

- комплект реагентов для экстракции ДНК «МАГНО-сорб», форма 4 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) при работе с кровью, перитонеальной (асцитической) жидкостью, культурами грибов – возбудителей ИК (рекомендован только ручной метод выделения);
- набор для выделения ДНК бактерий и грибов из культур микроорганизмов «ПРОБА-КМ» (ООО «ДНК-Технология») при работе с подращёнными гемокультурами возбудителей кандидоза;

ВНИМАНИЕ! Экспресс-методы выделения ДНК не допустимы!!!

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется использовать автоматические станции пробоподготовки из-за кратного снижения чувствительности (предела обнаружения) набора реагентов.

2. Вспомогательный комплект для предобработки клинических образцов цельной крови;

3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции, к набору/комплекту реагентов для выделения ДНК;

4. Ламинарный бокс II класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом;

5. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- Наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5 со следующими характеристиками:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал флуоресцентной детекции	Длины волн, нм	
	Возбуждения	Детекции
FAM	450-470	510-530
HEX	515-532	545-580
ROX	565-585	605-650
Cy5	620-640	660-690

Су5.5	660-690	705-750
-------	---------	---------

- Наличие подогреваемой крышки с температурой не менее 100°C;
- Точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;
- Скорость нагрева не менее 2°C/сек;
- Скорость охлаждения не менее 1°C/сек.

В ходе проведения клинико-лабораторных испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»:

- С1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399);
 - Амплификатор детектирующий «ДТпрайм», (РУ № ФСЗР 2011/10229).
6. Холодильник бытовой от 2 до 8 ° С с морозильной камерой не выше минус 14 ° С;
 7. Микроцентрифуга-вортекс;
 8. Пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом в диапазоне 0,5-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл;
 9. Одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов с защитным фильтром / аэрозольным барьером;
 10. Перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные (без талька) латексные или нитриловые;
 11. Штативы для микропробирок вместимостью 1,5-2 мл и 0,2 мл;
 12. Тонкостенные полипропиленовые 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 для амплификаторов планшетного типа;
 13. Контейнер для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

7.1. Материал для исследования

При исследовании для подтверждения диагноза «инвазивный кандидоз» используют следующие биологические субстраты человека (цельная венозная кровь, перитонеальная (асцитическая) жидкость) и образцы культур, в том числе подращённые гемокультуры, выделенные из стерильных в норме биосубстратов.

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

Взятие, предварительная обработка, хранение и перевозка, передача исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

7.2. Взятие материала на исследование

Цельная венозная кровь

Взятие цельной венозной крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа вакутейнеров объемом 2,0 или 4,0 мл, содержащие в качестве антикоагулянта 0,5М К2-ЭДТА, рН 8,0 (Пробирка Вакуэт с К2-ЭДТА (сиреневая крышка)). После взятия материала содержимое пробирок с К2-ЭДТА (венозная кровь с антикоагулянтом) необходимо тщательно, но аккуратно, не взбалтывая перемешать (образующаяся пена, влияет на качество исследования).

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

ВНИМАНИЕ!!! При работе с цельной венозной кровью с целью повышения чувствительности набора реагентов «Микоцентр кандида-тест» при исследовании биоматериала от пациентов с подозрением на кандидемиию рекомендуется использовать для анализа подращённые гемокультуры на селективных средах.

Перитонеальная (асцитическая) жидкость

Забор материала осуществляют с помощью пункции исследуемой области (брюшной полости) одноразовыми пункционными иглами, а также через дренажные устройства. Переносят 1,0 мл забранной жидкости в одноразовую стерильную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Плотнo закрывают крышку пробирки и маркируют пробирку.

Культуры дрожжевых грибов

Взятие материала с жидких и плотных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя.

Одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды помещают в пластиковую пробирку объемом 1,5-2,0 мл, в которую предварительно вносят 500 мкл стерильного физиологического раствора.

Плотно закрывают крышку пробирки и маркируют пробирку.

7.3. Транспортирование и хранение исследуемых образцов

Цельная венозная кровь

Образцы крови допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – не более 2-х часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 12 часов с момента взятия материала.

ВНИМАНИЕ! Замораживание цельной венозной крови не допускается!

Перитонеальная (асцитическая) жидкость

Образцы перитонеальной жидкости допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – не более 2-х часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток с момента взятия материала.

ВНИМАНИЕ! Замораживание перитонеальной жидкости не допускается!

Культуры дрожжевых грибов

Образцы дрожжевых культур на плотных питательных средах допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – не более 5 суток;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 14 суток.

Гемокультуры

Подращённые (положительные) гемокультуры на селективных средах допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – не более 12-х часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 48 часов.

7.4. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

Цельная венозная кровь

Провести предварительную обработку образцов цельной венозной крови согласно инструкции, прилагаемой к используемому набору/комплекту реагентов для экстракции НК.

При использовании комплект реагентов для экстракции ДНК «МАГНО-сорб», форма 4 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора):

1. В 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,25 мл цельной крови;
2. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая;
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин;
4. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком;
5. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован в 600 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб с последующим выделением ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «МАГНО-сорб».

Образцы перитонеальной (асцитической) жидкости

1. Центрифугировать пробирки с образцами в течение 10-15 минут на микроцентрифуге при максимальных оборотах.
2. Тщательно удалить пипеткой верхний слой жидкости, оставив на дне около 20-30 (но не более 50) мкл.
3. Оставшуюся нижнюю фракцию использовать для выделения НК согласно инструкции набора реагентов, используемого для экстракции ДНК.

Гемокультуры

1. Аккуратно, не захватывая осадок, наберите из флакона с выросшей культурой микроорганизмов не менее 100 мкл культуры при помощи стерильного одноразового шприца с иглой, путем прокола резиновой крышки после обработки ее дезинфицирующим средством. Для каждого флакона используйте новый шприц.

2. Перенесите 100 мкл забранной в шприц гемокультуры в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с предварительно внесенным промывочным раствором В («ПРОБА-КМ» (ООО «ДНК-Технология»)).

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемого материала;
- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов.

8.1. Выделение ДНК из исследуемого материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР:

- комплект реагентов для экстракции ДНК «МАГНО-сорб», форма 4 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) при работе с кровью, перитонеальной (асцитической) жидкостью, культурами грибов – возбудителей ИК (рекомендован только ручной метод выделения);
- набор для выделения ДНК бактерий и грибов из культур микроорганизмов «ПРОБА-КМ» (ООО «ДНК-Технология») при работе с подращёнными гемокультурами возбудителей кандидоза.

ВНИМАНИЕ! Экспресс-методы выделения ДНК не допустимы!!!

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется использовать автоматические станции пробоподготовки из-за кратного снижения чувствительности (предела обнаружения) набора реагентов.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту/набору реагентов. При работе с цельной венозной кровью **НЕОБХОДИМА** предобработка клинических образцов.

ВНИМАНИЕ!! Одновременно с выделением ДНК из исследуемого материала необходимо подготовить отрицательный контроль экстракции (К-), который представляет собой 200 мкл очищенной воды (в комплект набора не входит), прошедший все этапы пробоподготовки.

8.2. Подготовка компонентов набора и постановка реакции

1. Полностью разморозить компоненты набора при комнатной температуре. Пробирки с Реакционным буфером, ПЦР – смесью 1 *Candida auris* / *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) / *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*) / *C. tropicalis* и ПЦР – смесью 2 *Candida parapsilosis* / *C. albicans* / *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) / *Fungi spp.* тщательно перемешать.
2. Приготовить и промаркировать две одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл или 2,0 мл для приготовления амплификационных смесей.
3. Из компонентов набора приготовить две рабочие амплификационные смеси из расчета на 1 пробу:

I мультимикс

Компонент набора	Объем, мкл
Реакционный буфер	25 мкл
ПЦР-смесь 1 <i>Candida auris</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>) / <i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) / <i>C. tropicalis</i>	15 мкл
Раствор Таq-полимеразы	1 мкл

II мультимикс

Компонент набора	Объем, мкл
Реакционный буфер	25 мкл
ПЦР-смесь 2 <i>Candida parapsilosis</i> / <i>C. albicans</i> / <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) / <i>Fungi spp.</i>	15 мкл
Раствор Таq-полимеразы	1 мкл

После добавления раствора Таq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием и осадить капли с крышки пробирки.

4. Приготовить бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации по количеству образцов (по две на каждый образец), включая контрольные, и промаркировать.
5. Внести в соответствующие пробирки по 40 мкл приготовленной амплификационной смеси (I и II мультимикс).
6. В пробирки с амплификационными смесями (I и II мультимикс) добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы:
 - В пробирки исследуемых образцов (I и II) – 10 мкл ДНК исследуемого образца;

- В пробирки с отрицательным контролем экстракции (К-) – 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего процедуру выделения;
- В пробирки отрицательных контрольных образцов ПЦР (ОКО) - 10 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО), входящего в состав набора;
- В пробирки положительных контрольных образцов I и II (ПКО) – по 10 мкл ПКО ДНК1 *Candida auris* / *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) / *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*) / *C. tropicalis* / ДНК человека и ПКО ДНК 2 *Candida parapsilosis* / *C. albicans* / *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), соответственно.

7. Осадить амплификационную смесь в нижнюю часть пробирок, кратким центрифугированием на вортексе (1-2 сек).

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл.5). Для двух мультиплексных реакций был подобран единый оптимальный режим амплификации:

Таблица 5

Программа амплификации Набора реагентов «Микоцентр кандида-тест»

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Измерение флуоресценции	Количество циклов
95	05:00	-	1
95	00:30	-	35
55	00:30	-	
72	00:30	FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5	
4	∞	-	хранение

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

8.3. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! Применение настроек критически важно для получения корректных результатов!

Таблица 6

Настройки для амплификаторов с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» планшетного типа

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции				
		FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5
«CFX96» (Bio-Rad, США)	Русскоязычное ПО: Выбрать в меню пункт Настройки Циклы для анализа – Анализировать циклы с 5 по 35 Настройка базовой линии – Применить коррекцию смещения флуоресценции					
	Англоязычное ПО: Выбрать в меню пункт Settings Cycles to analyze – Analyze data from Cycle 5 to 35 Base line Setting – Apply Fluorescence Drift Correction					
	Base line threshold	100*	100*	100*	100*	100*
«ДТprime» (НПО ДНК-технология, Россия)	Base line threshold	10*	10*	10*	10*	10*
	Критерий положительного результата	90%				

* - ВНИМАНИЕ! Приведенные значения подходят к приборам данного типа в большинстве случаев. Однако для отдельных приборов или после перекалибровки шкала интенсивности может измениться. Для проверки адекватности следует выделить ячейки, где проводились тесты на присутствие интересующего вида грибов рода *Candida*, перейти в логарифмический режим отображения данных. В этих условиях правильному положению Threshold соответствует середина линейного участка подъема кривой.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции (характерной сигмовидной формы) для каждого из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Сt» (рассчитывается автоматически программой прибора) в соответствующей графе. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Соответствие наименованию ПЦР-смеси и каналов детекции возбудителей ИК приведено в таблице 1 раздела 2.1.

Анализ данных для ПЦР-смеси I и II следует проводить индивидуально, выделив область лунок, относящихся к анализируемому комплекту реагентов (ПЦР-смеси).

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении ПЦР-исследования

№ ПЦР-смеси	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)					Результат
	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5	
I	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено – при работе с биосубстратами; отсутствует – при работе с культурами	ДНК <i>Candida auris</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>) / <i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) / <i>C. tropicalis</i> не обнаружены
	определено	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено – при работе с биосубстратами; отсутствует – при работе с культурами	ДНК <i>Candida auris</i> обнаружена
	отсутствует	определено	отсутствует	отсутствует	определено – при работе с биосубстратами; отсутствует – при работе с культурами	ДНК <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>) обнаружена
	отсутствует	отсутствует	определено	отсутствует	определено – при работе с биосубстратами; отсутствует – при работе с культурами	ДНК <i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) обнаружена
	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено	определено – при работе с биосубстратами; отсутствует – при работе с культурами	ДНК <i>C. tropicalis</i> обнаружена
	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует – при работе с культурами	Невалидный

					биосубстратами	
II	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>Candida parapsilosis</i> / <i>C. albicans</i> / <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) / <i>Fungi</i> spp. не обнаружены
	определено	отсутствует	отсутствует	определено	не учитывается	ДНК <i>Candida parapsilosis</i> обнаружена
	отсутствует	определено	отсутствует	определено	не учитывается	ДНК <i>C. albicans</i> обнаружена
	отсутствует	отсутствует	определено	определено	не учитывается	ДНК <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) обнаружена

При анализе результатов необходимо учитывать значения гена β-глобина человека *Glob* (ПЦР смесь I, канал Cy5.5), как контроль выделения ДНК из материала, содержащего клетки человека, и фрагменту 5.8S рибосомальной ДНК грибов (ПЦР смесь II, канал Cy5), как эндогенный контроль реакции при работе с культурами дрожжевых грибов, и как маркер ИК, вызванного другими видами дрожжевых грибов, при анализе клинического материала).

ВНИМАНИЕ! При исследовании материала, не содержащего ДНК человека (перитонеальная (асцитическая) жидкость), значения гена β-глобина человека *Glob* (ПЦР смесь I, канал Cy5.5) не учитываются.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК возбудителей ИК обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;

- ДНК возбудителей ИК не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение порогового цикла *Ct*;

- результат анализа считается невалидным, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла по соответствующему каналу детекции возбудителей ИК и по каналу Cy5.5 (ПЦР смесь I) значение также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения Ct указаны во вкладыше к набору «Микоцентр кандидата-тест».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и результатов по гену *Glob* и фрагменту 5.8S рибосомальной ДНК грибов, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций.

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь I						
Контроль	Контролируемый этап исследования	Сигнал по каналу				
		FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5
		Детекция возбудителя ИК	Детекция возбудителя ИК	Детекция возбудителя ИК	Детекция возбудителя ИК	Детекция ДНК человека
К-	Экстракции ДНК/ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	Экстракции ДНК/ПЦР
ОКО	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО	ПЦР	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>отсутствует</u>
ген <i>Glob</i>	Экстракции ДНК (при работе с биоматериалом)*	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>Меньше</u> порогового значения
ПЦР-смесь II						
Контроль	Контролируемый этап исследования	Сигнал по каналу				
		FAM	HEX	ROX	Cy5	
		Детекция возбудителя ИК	Детекция возбудителя ИК	Детекция возбудителя ИК	5.8S рДНК грибов	
К-	Экстракции ДНК/ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	
ОКО	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	
ПКО	ПЦР	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения	
5.8S рДНК грибов	Экстракции ДНК (при работе с культурами)	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>Меньше</u> порогового значения	

* При исследовании материала, не содержащего ДНК человека, значения гена *Glob* не учитываются

ВНИМАНИЕ!

Если для положительного контрольного образца (ПКО) значения порогового цикла по каналам соответствующим видам детектируемых/идентифицируемых возбудителей ИК

отсутствует или превышает граничное значение порогового цикла, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

Если для отрицательного контроля экстракции (К-) значения порогового цикла по каналу детекции возбудителя меньше граничного значения, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых была обнаружена ДНК возбудителя, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить возможную контаминацию.

Если для отрицательного контрольного образца ПЦР (ОКО) значения порогового цикла по каналу детекции возбудителя меньше граничного значения, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых была обнаружена ДНК возбудителя, начиная с этапа постановки реакции амплификации, чтобы исключить возможную контаминацию.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Аналитическая чувствительность набора реагентов была определена на основе двух подходов: (1) определение минимального геном эквивалента (анализ с этапа постановки реакции амплификации) и (2) определение минимальной концентрации дрожжевых клеток (колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл) в анализируемых биосубстратах (анализ с этапа экстракции ДНК), необходимого для прохождения ПЦР.

(1) Предел обнаружения набора реагентов был определен путем анализа серийных 10-кратных разведений ДНК от 10^6 до 10 копий генома на реакцию для 1 штамма, паспортизованного и депонированного в Российскую коллекцию патогенных грибов (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина) с подтвержденной видовой идентификацией таргетным ДНК-секвенированием по региону ITS рДНК (стандартных лабораторных контрольных образцов), каждого из детектируемых/идентифицируемых видов грибов рода *Candida* в двух повторах.

Количество копий генома рассчитывали с помощью формулы:

Количество копий генома = (количество ДНК [нг] * 6.022×10^{23}) / (длина генома [п.о.] * 1×10^9 * 650).

Таблица 9

Процент тестируемых штаммов грибов рода *Candida* для каждой из анализируемых концентраций (количество копий генома на реакцию)

Анализируемые виды грибов рода <i>Candida</i>	Количество копий генома на реакцию					
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10
<i>C. albicans</i>	100%	100%	60%	40%	20%	н/о
<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	100%	100%	100%	100%	60%	20%
<i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)	100%	100%	80%	60%	н/о	н/о
<i>C. tropicalis</i>	100%	100%	100%	100%	100%	80%
<i>C. parapsilosis</i>	100%	100%	80%	40%	н/о	н/о
<i>C. guilliermondii</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>C. auris</i>	100%	100%	100%	20%	20%	н/о

Предел обнаружения набора «Микоцентр кандиды-тест» составляет: для грибов *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. guilliermondii* и *C. tropicalis* 10 копий ДНК на реакцию, для *C. auris* и *C. albicans* – 100 копий/реакция; для *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*) и *C. parapsilosis* - 10^3 копий/реакция.

(2) Минимальное количество КОЕ дрожжевых клеток на 1 мл анализируемого биосубстрата, необходимых для прохождения реакции амплификации, было рассчитано на основании тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем внесения суспензий анализируемых грибов (стандартных лабораторных контрольных образцов) в образцы биоматериала, предусмотренные назначением набора (цельная кровь, перитонеальная жидкость, среда для гемокультивирования), эквивалентные стандарту McFarland 0,5 (10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл) в соотношении 1:10 (конечная концентрация составляла 10^5 КОЕ грибов рода *Candida* на мл биосубстрата), с последующим приготовлением последовательных 10-кратных разведений соответствующими биосубстратами. В качестве контроля использовали физиологический раствор (натрия хлорид 0,9%). Точные концентрации КОЕ/мл определяли путем посева 100 мкл модельных образцов на агаризованную питательную среду Сабуро с хлорамфениколом, подсчет колоний осуществляли после 48-часовой инкубации при 37°C. Выделение ДНК осуществляли наборами/комплектами реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия, указанными в разделе 8.1.

Предел обнаружения патогенов Набором реагентов «Микоцентр кандида-тест» при работе с анализируемыми биосубстратами в зависимости от вида гриба представлен в таблице 10.

Таблица 10

Предел обнаружения набора реагентов «Микоцентр кандида-тест» при работе с различными биосубстратами (КОЕ/мл)

Порог чувствительности	Анализируемые виды грибов рода <i>Candida</i>						
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. auris</i>
Кровь	1×10^2	1×10^2	1×10^3	1×10^3	1×10^2	1×10^3	1×10^3
Перитонеальная жидкость	5×10^2	1×10^2	5×10^2	5×10^2	1×10^2	5×10^2	5×10^2
Гемокультура	5×10	5×10	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
Физраствор	1×10	1×10	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2

Таким образом, для большинства анализируемых видов грибов рода *Candida* порог детекции в таких биосубстратах, как кровь и перитонеальная жидкость, был на порядок ниже, чем при работе с чистыми культурами возбудителей ИК, суспензированными в физиологическом растворе, или гемокультурами, вероятно, из-за присутствия

интерферирующих веществ, влияющих на процесс экстракции ДНК, и естественной микробицидной/микростатической активности данных биосубстратов.

Образцы цельной венозной крови и перитонеальной жидкости, взятые в качестве контроля, не приводили к ложноположительным результатам или полному ингибированию ПЦР анализа.

ВНИМАНИЕ!!! При работе с цельной венозной кровью с целью повышения чувствительности набора реагентов «Микоцентр кандида-тест» при исследовании биоматериала от пациентов с подозрением на кандидемию рекомендуется использовать для анализа подращённые гемокультуры на селективных средах.

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «Микоцентр кандида-тест» выявляет и идентифицирует только фрагменты ДНК *C. albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* и *C. auris*.

Аналитическая специфичность набора реагентов была оценена на ДНК клинических изолятов микроскопических грибов, депонированных в Российскую коллекцию патогенных грибов (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина). В анализ было включено по 1 штамму каждого из детектируемых/идентифицируемых набором реагентов видов грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* и *C. auris* и 20 штаммов других видов грибов, потенциальных патогенов человека и контаминантов помещений: *Nannizzia persicolor*, *Arthroderma gertleri*, *Trichophyton simii*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton rubrum*, *Lophophyton gallinae*, *Sarocladium kiliense*, *Corallomyces repens*, *Nannizzia incurvata*, *Arthroderma phaseoliforme*, *Arthroderma insingulare*, *Falciformispora senegalensis*, *Aureobasidium melanogenum*, *Cladophialophora bantiana*, *Phialophora macrospora*, *Fonsecaea monophora*, *Aspergillus versicolor*, *Emmonsia crescens*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chermesinum*, а также 3 образца ДНК человека. Тестирование проводили при концентрации ДНК 60 нг на реакцию (около 5×10^6 копий ДНК/реакция).

Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций для каждой пары праймеров и зонда, входящих в состав набора реагентов, а также неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образцах ДНК других видов грибов и/или ДНК человека; для реакции с универсальными пангрибковыми праймерами и зондом положительный сигнал был зарегистрирован для всех анализируемых проб, содержащих ДНК микроскопических грибов.

Для образцов исследуемого материала, содержащего ДНК выявляемых/идентифицируемых возбудителей ИК, фиксировались положительные результаты амплификации (специфические кинетические кривые флуоресценции) по заявленным каналам детекции.

9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Оценку воспроизводимости и повторяемости проводили путем тестирования модельных образцов, приготовленных путем контаминации образцов биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, суспензиями анализируемых грибов (стандартных лабораторных контрольных образцов) до концентрации ДНК грибов около 60 нг на реакцию (около 5×10^6 копий ДНК/реакция). Каждый модельный образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени.

Условия воспроизводимости включали в себя тестирование разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов.

При оценке повторяемости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов для ДНК выявляемых грибов, не превышал 5 %.

При оценке воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов для ДНК выявляемых грибов, не превышал 10 %.

Таблица 11

Совпадение результатов исследования тестовых образцов

Модельный образец	Показатель	Внутрилабораторная воспроизводимость (2 повтора каждого образца)	Повторяемость результатов (3 повтора каждого образца)
Гемокультура	<i>C. auris</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>C. albicans</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>C. parapsilosis</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>C. tropicalis</i>	10 из 10	7 из 7
К Р с	<i>C. auris</i>	10 из 10	7 из 7

	<i>C. albicans</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>C. parapsilosis</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>C. tropicalis</i>	10 из 10	7 из 7
Перитонеальная жидкость	<i>C. auris</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>C. albicans</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	10 из 10	7 из 7
	<i>C. parapsilosis</i>	10 из 10	7 из 7
	<i>C. tropicalis</i>	10 из 10	7 из 7

9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и чувствительности Набора реагентов «Микоцентр кандиды-тест» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 12.

В качестве методики сравнения, с помощью которой устанавливали наличие/отсутствие ДНК в биоматериале, использовали метод культурального исследования с идентификацией полученной чистой культуры таргетным ДНК-секвенированием по региону ITS рДНК.

Таблица 12

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «Микоцентр кандиды-тест»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	Количество	Образцы	Тестируемый набор	Методика сравнения
			«Микоцентр кандиды-тест»	Культуральное исследование
Чистая культура дрожжей	140	Положительных	70	70
		Отрицательных	70	70

Гемокультура	35	Положительных	15	15
		Отрицательных	20	20
Кровь		Положительных	14	16
		Отрицательных	20	20
Перитонеальная жидкость	15	Положительных	4	5
		Отрицательных	10	10

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «Микоцентр кандида-тест» с доверительной вероятностью 95%, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 13.

Таблица 13

Диагностические характеристики набора реагентов «Микоцентр кандида-тест»

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность	Прогностическая ценность положительного результата	Прогностическая ценность отрицательного результата	Диагностическая эффективность
Чистая культура дрожжей	100%	100%	100%	0%	100%
Гемокультура	100%	100%	100%	0%	100%
Кровь	100%	87,5%	100%	9,09%	94,44%
Перитонеальная жидкость	100%	80%	100%	9,09%	93,33%

9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Наличие интерферирующих веществ в образце биологического материала может быть причиной ингибирования ПЦР и получения недостоверных результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации фрагмента гена β -глобина человека *Glob* (при работе с биосубстратами человека) / специфического для всех грибов фрагмента рДНК (использование пан-фунгальных праймеров) (при работе с культурами дрожжевых грибов) и специфического продукта реакции (см. раздел 2.1, раздел 8.3).

Ключевым ингибитором ПЦР по результатам анализа рисков являются компоненты исследуемых биологических субстратов: крови (гемоглобин) и перитонеальной (асцитической) жидкости (альбумин), которые могут присутствовать в образцах ДНК, выделенных из образцов, соответствующих биосубстратов, в результате неполного удаления в ходе процесса экстракции ДНК. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции

интерферирующих веществ, представленных в таблице 14, в максимально возможной концентрации.

Таблица 14

Интерферирующие вещества, используемые при тестировании набора
«Микоцентр кандиды-тест»

Вид биоматериала	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце
Кровь	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы 170 г/л)
Перитонеальная жидкость	Альбумин	500 мг/л (верхняя граница нормы 20 мг/л)
	Защеление перитонеальной жидкости	pH 5,0 (значение pH в норме 7,5-8,0)

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации 10 нг/мкл и ДНК бактериальной массы в концентрации $1,0 \times 10^6$ копий/мл.

9.6. Оценка прослеживаемости значений положительных контрольных образцов

При оценке прослеживаемости значений положительных контрольных образцов показана низкая вариабельность коэффициента вариации (CV, %) ΔCt (значений порогового цикла) для положительных контрольных образцов (ПКО ДНК1 и ПКО ДНК2) набора реагентов «Микоцентр кандиды-тест», составляющая от 0,43% до 2,56% от среднего при сравнении между серий и от 1,06% до 3,49% - при сравнении внутри серий, что указывает на однородность полученной совокупности значений порогового цикла по каналам детекции флуоресценции FAM, HEX, ROX, Cy5 и Cy5.5 как при сравнении внутри серий реагентов, так и при сравнении между сериями набора реагентов (получены коэффициенты вариации менее 33%).

Значения диапазона циклов (Ct) положительных контрольных образцов (ПКО), на котором должны выходить значения ПКО от серии к серии указаны в таблице 15.

Таблица 15

Диапазоны циклов (Ct) положительных контрольных образцов (ПКО)

Образцы	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5
	$\Delta Ct \pm SD^*$ (CV**,%)	$\Delta Ct \pm SD^*$ (CV**,%)	$\Delta Ct \pm SD^*$ (CV**,%)	$\Delta Ct \pm SD^*$ (CV**,%)	$\Delta Ct \pm SD^*$ (CV**,%)
ПКО ДНК1	18,51 ± 1,29 (7%)	18,48 ± 1,29 (7%)	18,47 ± 1,29 (7%)	19,55 ± 1,37 (7%)	16,09 ± 1,13 (7%)
ПКО ДНК2	18,33 ± 1,28 (7%)	17,86 ± 1,25 (7%)	18,94 ± 1,33 (7%)	17,76 ± 1,24 (7%)	-

* - Стандартное отклонение

** - Коэффициент вариации

Минимальное значения уровня разгорания флуоресценции положительных контрольных образцов (ПКО) по всем каналам (FAM, HEX, ROX, Cy5 и Cy5.5), которого должны достигать кривые положительных контрольных образцов (ПКО) от серии к серии для амплификатора С1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399) – 500 ОЕФ (относительных единиц флуоресценции).

Контрольные материалы в составе набора реагентов относятся к контрольным материалам, которые используют только для внутреннего контроля качества в медицинских лабораториях для оценки неprecизионности медицинского изделия для диагностики *in vitro*, повторяемости или воспроизводимости и/или для оценки результатов медицинского изделия для диагностики *in vitro* по сравнению с полученными в условиях ранее выполненной калибровки.

10. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска. 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 всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с Правилами перевозки грузов, действующими на транспорте данного вида, не более 5 суток. При получении незамедлительно обеспечить хранение набора реагентов строго в соответствии с условиями хранения.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Хранение. Хранение набора реагентов в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре не от минус 20 до минус 14 °С при относительной влажности воздуха от 40% до 80% в течение всего срока годности в морозильной камере, обеспечивающей регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

ВНИМАНИЕ! Наборы реагентов с нарушенным контролем первого вскрытия применению не подлежат.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие выпускаемых наборов реагентов требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество наборов реагентов гарантируется в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки набора реагентов, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Изготовитель обязуется за свой счет заменить набор реагентов, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Набор реагентов техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Изготовитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России)

Адрес производства: Сергиево-Посадский филиал ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, 141321, РФ, МО, Сергиево-Посадский городской округ, п. Зеленая Дубрава, <https://cniivi.ru>, nokpc@cniivi.ru.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу: Сергиево-Посадский филиал ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, 141321, РФ, МО, Сергиево-Посадский городской округ, п. Зеленая Дубрава, <https://cniivi.ru>, nokpc@cniivi.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 набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

12. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

Использованный набор реагентов относится к отходам класса Б и утилизируется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Неиспользованный набор реагентов относится к отходам класса Б в случае невозможности применения (истечение срока годности, повреждение упаковки, нарушение условий хранения и/или транспортирования) и утилизируется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, должны быть утилизированы как отходы класса Б, в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21.

Для обеззараживания и/или обезвреживания отходов в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» использовать зарегистрированные в РФ дезсредства и оборудование в соответствии с инструкциями по их применению.

Отходы утилизировать через организации, имеющие лицензию на этот вид деятельности.




Утилизации должна подлежать вся упаковка, в том числе и транспортная. Транспортная упаковка в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21 относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора, должен соблюдать правила безопасности.

13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Дата изготовления
	Температурный диапазон		Обратитесь к инструкции по применению
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Номер по каталогу
	Использовать до		Изготовитель
	Код партии (серия набора реагентов)		Не допускается воздействие солнечного света
	Не использовать при повреждении упаковки		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Беречь от влаги		Нестерильно!

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ ТРАНСПОРТНОЙ ТАРЫ

	Хрупкое. Осторожно.		Беречь от влаги
	Температурный диапазон		Не допускается воздействие солнечного света
	Верх. Не кантовать.		Особая утилизация

15. Перечень применяемых производителем МИ национальных стандартов

ГОСТ Р 1.3-2018	Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению.
ГОСТ 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения
ГОСТ Р 15.013-2016	Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, комплекты реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003)	Лаборатории медицинские. Требования безопасности
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
СанПиН 2.1.3684-21	Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий
СанПиН 3.3686-21	Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней
МУ 287-113	Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности
Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н	Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий.

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ССЫЛКИ

1. de Boer MGJ, Walzer PD, Mori S. Healthcare related transmission of Pneumocystis pneumonia: From key insights toward comprehensive prevention // *Transpl Infect Dis*. 2018 Oct; 20(5): e12942. doi: 10.1111/tid.12942. Epub 2018 Jun 28.
2. Patel G, Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis // *Allergy Asthma Proc*. 2019 Nov 1;40(6):421-424. doi: 10.2500/aap.2019.40.4262.
3. Arastehfar A, Carvalho A, van de Veerdonk FL, Jenks JD, Koehler P, Krause R, Cornely OA, S Perlin D, Lass-Flörl C, Hoenigl M. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)-From Immunology to Treatment // *J Fungi (Basel)*. 2020 Jun 24;6(2):91. doi: 10.3390/jof6020091.
4. McCarty T.P., White C.M., Pappas P.G. Candidemia and Invasive Candidiasis // *Infect Dis Clin North Am*. 2021 Jun;35(2):389-413. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.007.
5. Suleyman G, Alangaden GJ. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention // *Infect Dis Clin North Am*. 2021 Dec;35(4):1027-1053. doi: 10.1016/j.idc.2021.08.002.
6. Brown G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections // *Sci Transl Med* 4: 165rv13. – 2012.
7. GAFFI (Global Action Fund for Fungal Infections). Improving outcomes for patients with fungal infections across the world // *A road map for the next decade*. 20158. Esher et al., 2018
9. Е.Р. Рауш, Н.В. Васильева, А.Г. Полищук, Е.В. Шагдилеева, Д.М. Лавникевич, М.В. Руднева, Ю.В. Михайлова, Н.Н. Клишко. Определение видов возбудителей инвазивного кандидоза: в поиске быстрых решений // *Проблемы медицинской микологии*. 2013. Т. 15, №4. С. 87-91.
10. Vasilyeva N. V. et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey // *Frontiers of medicine*. – 2018. – Т. 12. – №. 1. – С. 84-91.
11. Клишко Н. Н., Козлова О. П. Инвазивный кандидоз у детей // *Журнал инфектологии*. 2021. 13(2):14-26. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-2-14-26>
12. Denning D. W. et al. Delivering on antimicrobial resistance agenda not possible without improving fungal diagnostic capabilities // *Emerging infectious diseases*. – 2017. – Т. 23. – №. 2. – С. 177.