

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и  
благополучия человека (ФБУН  
ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора)

« 10 » В.Г. Акимкин  
2019 г.



## РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения  
АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist  
версия 1.0

**АмплиСенс®**



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора,  
Российская Федерация, 111123,  
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА .....	3
ПРИНЦИП РАБОТЫ .....	3
УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	4
ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ.....	5
ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	7
СООБЩЕНИЯ ОБ ОШИБКАХ ОПЕРАТОРА ПО .....	10

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

ПО	- программное обеспечение, программа
ПЦР	- полимеразная цепная реакция

## НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0. предназначено для автоматической обработки результатов при использовании набора реагентов АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL. Программное обеспечение (ПО) представляет собой шаблон расчета результатов в формате Microsoft® Excel.

Дата выпуска: 14.10.2019

**Класс безопасности:** Класс А (невозможны никакие травмы и ущерб здоровью) в соответствии с п.4.3 ГОСТ Р МЭК 62304.

ПО АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0 и руководство оператора представлены пользователю на электронном носителе информации или на сайте Изготовителя.

## ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Персональный компьютер с предустановленным пакетом приложений Microsoft® Office 2003 и выше. Системные требования приведены на официальном сайте <http://technet.microsoft.com/ru-ru/library/ee624351.aspx>

## ПРИНЦИП РАБОТЫ

Для работы ПО АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0. необходима программа Microsoft® Excel. ПО использует встроенный язык программирования Microsoft Visual Basic for Applications (MS VBA).

В качестве исходных данных ПО АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0. (далее – программа) использует значения пороговых циклов (*C<sub>t</sub>*) и максимальный конечный уровень нормированного флуоресцентного сигнала, полученные ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», для исследуемых образцов, контролей и калибраторов.

Программа проводит автоматическое построение графиков калибровки, расчет концентраций и анализ достоверности результатов.

## УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для автоматической обработки результатов необходимо соблюдать следующие условия:

1. Необходимо убедиться, что система безопасности Microsoft® Excel позволяет использовать макросы. В меню **Сервис>Макрос>Безопасность** установите **Средний уровень защиты**.
2. Исходные данные должны быть получены ПО используемого прибора, в соответствии с инструкцией по применению к набору реагентов. Данные могут быть перенесены непосредственно из ПО прибора, либо из файла экспорта данных в Excel.
3. Ячейки раздела **Данные прибора** должны быть заполнены без ошибок, значения *Ct* должны соответствовать образцу и каналу детекции. Обозначения образцов и соответствующих им значений *Ct* должны быть внесены в одинаковой последовательности для двух блоков (для ПЦР-смеси-FL Mg/ML и ПЦР-смеси-FL Mg/FQ).
4. Контрольные образцы в столбце **Обозначение образца** должны быть подписаны в соответствии с таблицей **Обозначение контрольных образцов** (вкладка **Инструкция**). Регистр букв значения не имеет.

# ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

## Вкладка *Инструкция*

### АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist

#### Назначение

Программное обеспечение АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0. предназначено для автоматической обработки результатов при использовании набора реагентов АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL

#### Описание результатов

Статус	Описание
Невалидный	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ отсутствует или больше граничного значения, при этом данные по всем каналам спецификации (каналы для флуорофора FAM и ROX на ПЦР-смесь-FL <i>Mg</i> /ML и канал для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ) отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции
<i>M.genitalium</i> не обнаружено	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> отсутствует по всем каналам спецификации (по каналам для флуорофоров FAM и ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /ML; для флуорофора JOE на ПЦР-смесь-FL <i>Mg</i> /FQ). При этом определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ
Низкая концентрация возбудителя. Невозможно определить присутствие мутаций	В исследуемом образце рассчитанное значение концентрации по каналу для флуорофоров ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /ML меньше $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл (10 ГЭ/реакция)
ОБНАРУЖЕНЫ мутации в участке, ответственном за резистентность к МАКРОЛИДАМ	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /ML отсутствует В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /ML присутствует и при этом выполняется хотя бы одно из условий: $F <$ граничного значения и/или $d \lg(C) >$ граничного значения, и/или $K <$ граничного значения
ОБНАРУЖЕНЫ мутации в участке, ответственном за резистентность к ФТОРХИНОЛОНАМ	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ отсутствует В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ присутствует и при этом выполняется хотя бы одно из условий: $F <$ граничного значения и/или $d \lg(C) >$ граничного значения, и/или $K <$ граничного значения.
НЕ ОБНАРУЖЕНО мутаций в участках, ответственных за резистентность к МАКРОЛИДАМ и ФТОРХИНОЛОНАМ	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /ML присутствует и при этом выполняются следующие условия: $F \geq$ граничного значения, $d \lg(C) \leq$ граничного значения и $K \geq$ граничного значения; значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ присутствует и при этом выполняются следующие условия: $F \geq$ граничного значения, $d \lg(C) \leq$ граничного значения и $K \geq$ граничного значения
Контаминация?	Для образца К- присутствует <i>Ct</i> -1 хотя бы по одному из каналов для флуорофоров FAM и/или ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /ML или для флуорофоров JOE и/или ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ
Ошибка!	Для образца К- присутствует <i>Ct</i> -2 или значение в столбце «а» хотя бы по одному из каналов для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /ML, для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg</i> /FQ
ОК	Получены правильные результаты для контролей этапа амплификации (калибраторы K1 и K2, К-)
Сбой!	Для образцов калибраторов K1 и K2 отсутствуют <i>Ct</i> -1 и/или <i>Ct</i> -2 хотя бы по одному из каналов детекции

#### Обозначения

Тип контрольного образца	Возможные обозначения
Калибраторы (K1, K2)	РУС: K1, K2 ЛАТ: K1, C1, K2, C2
Отрицательный контроль амплификации	РУС: К- ЛАТ: К-, NCA

# Вкладка **Результат**

R14C9

**АмплиСенс® M.genitalium-ML/FQ-Resist**

Очистить

**Параметры**

Очистить

Информация о постановке

Дата

Специал

Ссылка

Фамилия пациента

Имя пациента

Имя прибора

Комплектация

Титратор 1:

Титратор 2:

**Данные прибора**

№	Обозначение образца	ЛД/Концентрация Мг/Мл				ЛД/Концентрация Мг/РД			
		FAM Green	ACI Orange	JOE Yellow	RES	FAM Green	ACI Orange	JOE Yellow	RES
1	1								
2	2								
3	3								
4	4								
5	5								
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									

**Расчетные данные/Результаты**

№	ЛД/Концентрация Мг/Мл			ЛД/Концентрация Мг/РД			Результат
	FAM Green	ACI Orange	JOE Yellow	FAM Green	ACI Orange	JOE Yellow	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							

**Калибровка**

Дата калибровки

Эффективность E (N: 0.7-1.0)

Статус калибровки

Калибровочный график - FAM/Green Mix1

Калибровочный график - ACI/Orange Mix2

Калибровочный график - JOE/Yellow Mix2

## ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Проверить, что система безопасности Microsoft® Excel позволяет использовать макросы.
  - Для Microsoft® Excel 2003: во вкладке Меню выбрать **Сервис>Макрос>Безопасность** и установить **Средний уровень защиты**.
  - Для Microsoft® Excel 2007: нажать кнопку **Office** в верхнем левом углу и выбрать пункт **Параметры>Центр управления безопасностью>Параметры центра управления безопасностью>Параметры макросов>**. Поставить галочки напротив **Включить все макросы** и **Доверять доступ к объектной модели проектов VBA**.
  - Для Microsoft® Excel 2010 и Microsoft® Excel 2013: в меню **Файл** выбрать пункт **Параметры>Центр управления безопасностью>Параметры центра управления безопасностью>Параметры макросов>**. Поставить галочки напротив **Включить все макросы** и **Доверять доступ к объектной модели проектов VBA**.
2. Открыть файл с программой, принять включение макросов.
3. Во вкладке **Результат** проверить, что активна кнопка **Рассчитать**.
4. Если таблица заполнена данными из предыдущей постановки, ее можно очистить путем нажатия кнопки **Очистить**.
5. В разделе **Параметры** ввести информацию о постановке.
6. В разделе **Данные прибора** заполнить столбец **Обозначение образца** в соответствии с расположением образцов в реакционном блоке и полученными значениями *Ct*.
7. Вставить значения *Ct*, полученные по каналу для флуорофора FAM на **ПЦР-смеси-FL Mg/ML** при уровне пороговой линии (**Threshold**) = 0,1 в столбец **Ct-1**, а полученные при уровне пороговой линии (**Threshold**) = 0,4 – в столбец **Ct-2**.
8. Вставить значения *Ct*, полученные по каналу для флуорофора JOE на **ПЦР-смеси-FL Mg/FQ** при уровне пороговой линии (**Threshold**) = 0,1 в столбец **Ct-1**, а полученные при уровне пороговой линии (**Threshold**) = 0,4 – в столбец **Ct-2**.
9. Вставить значения *Ct*, полученные по каналу для флуорофора ROX при уровне пороговой линии (**Threshold**) = 0,1 на **ПЦР-смеси-FL Mg/ML** и на **ПЦР-смеси-FL Mg/FQ**, в столбцы **Ct**.

Данные могут быть перенесены непосредственно из ПО прибора, либо из файла экспорта данных в Excel.

10. Заполнить столбец «а», для этого необходимо последовательно для каждого образца определить максимальный конечный уровень нормированного флуоресцентного сигнала непосредственно в ПО прибора (значения **Норм. Флуоресц.** от 0 до 1,2 единиц).

11. Обозначить контрольные образцы в соответствии с таблицей **Обозначения контрольных образцов** (вкладка **Инструкция**). Регистр букв значения не имеет.

12. Сохранить файл под другим именем.

13. Нажать кнопку **Рассчитать**. Будут отображены расчетные концентрации, коэффициенты  $d \lg(C)$ , F и K, статусы образцов и полученные калибровочные графики, значения эффективности и коэффициента корреляции.

Результаты исследования выдаются в следующем виде:

The screenshot displays the software interface for 'AmpliSens® M.genitalium-ML/FQ-Resist'. It is divided into several sections:

- Параметры (Parameters):** Includes fields for 'Дата' (Date), 'Сектор' (Sector), 'Сария №' (Sample No.), 'Срок годности' (Expiry Date), 'Имя образца' (Sample Name), and 'Примечание' (Remarks). There are also input fields for 'Титрало 1' (0.1) and 'Титрало 2' (0.4).
- Данные прибора (Instrument Data):** A table with columns for 'Идентификация образца' (Sample ID), 'ПЦР-смесь F1 Mg/ML' (PCR mix F1 Mg/ML), and 'ПЦР-смесь F1 Mg/FL' (PCR mix F1 Mg/FL). It contains data for 28 samples, with some cells highlighted in orange.
- Расчетные данные/Результаты (Calculated Data/Results):** A table with columns for 'ПЦР-смесь F1 Mg/ML' and 'ПЦР-смесь F1 Mg/FL'. It includes columns for 'Концентрация' (Concentration), 'd lg(C)' (Coefficient), 'F', and 'K'. The 'Результат' (Result) column contains text such as 'Обнаружены мутиции в участке, ответственном за...'. Some cells are highlighted in orange.
- Калибровка (Calibration):** A section showing 'Статус калибровки' (Calibration Status) with a table of 'F' and 'K' values. Below it are three calibration graphs: 'FAM/Blue Mix2', 'ROX/Orange Mix2', and 'ROX/Yellow Mix2', each with a linear regression equation and R-squared value.

В разделе **Расчетные данные/Результаты** будут отображены расчетные концентрации, коэффициенты  $d \lg(C)$ , F и K.

В ячейках **Концентрация ГЭ/реакция** выводятся концентрации каждой ДНК-мишени, рассчитанные по калибровочным графикам по соответствующему каналу детекции и ПЦР-смеси-FL. В случае концентрации возбудителя ниже 10 ГЭ/реакция или его отсутствия в образце, соответствующее поле остается пустым. В случае концентрации возбудителя ниже 10 ГЭ/реакция по каналу для флуорофора ROX на ПЦР-смеси-FL Mg/ML выдается результат **<10 (ГЭ/реакция)**.



В ячейках **d Ig(C)**, **F** и **K** выводятся рассчитанные по калибровочным графикам, значениям *Ct* и конечным уровням флуоресценции соответствующие коэффициенты по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL *Mg/ML* и по каналу для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL *Mg/FQ*. В случае концентрации возбудителя ниже 10 ГЭ/реакция или его отсутствия в образце, соответствующее поле остается пустым.

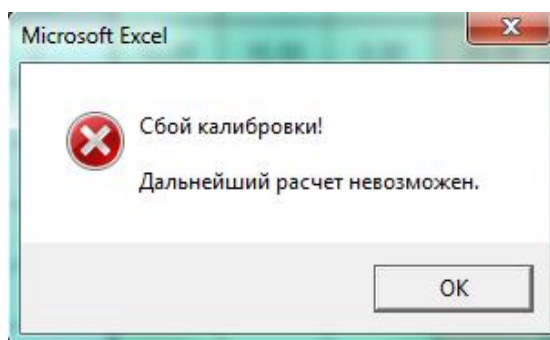
В столбце **Результат** будет отображен статус образцов.

Варианты результатов для исследуемых проб и контролей, выдаваемые в столбце **Результат**:

Статус	Описание
<b>Невалидный</b>	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i> отсутствует или больше граничного значения, при этом данные по всем каналам спецификации (каналы для флуорофора FAM и ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/ML</i> и канал для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i> ) отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции
<b><i>M.genitalium</i> не обнаружено</b>	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> отсутствует по всем каналам спецификации (по каналам для флуорофоров FAM и ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/ML</i> ; для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i> ). При этом определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i>
<b>Низкая концентрация возбудителя. Невозможно определить присутствие мутаций</b>	В исследуемом образце рассчитанное значение концентрации по каналу для флуорофоров ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/ML</i> меньше $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл (10 ГЭ/реакция)
<b>ОБНАРУЖЕНЫ мутации в участке, ответственном за резистентность к МАКРОЛИДАМ</b>	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/ML</i> отсутствует
	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/ML</i> присутствует и при этом выполняется хотя бы одно из условий: $F < \text{граничного значения}$ и/или $d \text{ Ig(C)} > \text{граничного значения}$ , и/или $K < \text{граничного значения}$
<b>ОБНАРУЖЕНЫ мутации в участке, ответственном за резистентность к ФТОРХИНОЛОНАМ</b>	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i> отсутствует
	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i> присутствует <i>Ct</i> и при этом выполняется хотя бы одно из условий: $F < \text{граничного значения}$ и/или $d \text{ Ig(C)} > \text{граничного значения}$ , и/или $K < \text{граничного значения}$
<b>НЕ ОБНАРУЖЕНО мутаций в участках, ответственных за резистентность к МАКРОЛИДАМ и ФТОРХИНОЛОНАМ</b>	В исследуемом образце значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/ML</i> присутствует и при этом выполняются следующие условия: коэффициент $F \geq \text{граничного значения}$ и $d \text{ Ig(C)} \leq \text{граничного значения}$ и $K \geq \text{граничного значения}$ ; значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i> присутствует и при этом выполняются следующие условия: коэффициент $F \geq \text{граничного значения}$ , $d \text{ Ig(C)} \leq \text{граничного значения}$ и $K \geq \text{граничного значения}$
<b>Контаминация?</b>	Для образца К- присутствует <i>Ct</i> -1 хотя бы по одному из каналов для флуорофоров FAM и/или ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg-ML</i> или для флуорофоров JOE и/или ROX на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i>
<b>Ошибка!</b>	Для образца К- присутствует <i>Ct</i> -2 или значение в столбце «а» хотя бы по одному из каналов для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-FL <i>Mg-ML</i> , для флуорофора JOE на ПЦР-смеси-FL <i>Mg/FQ</i>
<b>ОК</b>	Получены правильные результаты для контролей этапа амплификации (калибраторы К1 и К2, К-)
<b>Сбой!</b>	Для образцов калибраторов К1 и К2 отсутствуют <i>Ct</i> ( <i>Ct</i> -1 и/или <i>Ct</i> -2) хотя бы по одному из каналов детекции

Раздел **Калибровка** предназначен для вывода калибровочных графиков, значений коэффициентов корреляции ( $R^2$ ) и эффективности амплификации (E), статуса калибровки.

Если для калибраторов K1 и K2 значения  $C_t$  внесены неправильно, отсутствуют или показатель эффективности при построении калибровочной прямой менее 70 % или более 120 % и/или значение коэффициента корреляции ( $R^2$ ) менее 0,9, то программа выдает сообщение:

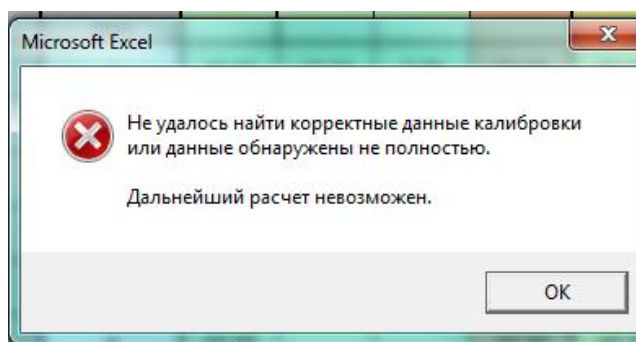


при этом в поле **Калибровка** в таблице **Статус калибровки** в ячейке соответствующего канала выводится сообщение **Сбой!(Эфф.)**.

**ВНИМАНИЕ!** Информация о принципе интерпретации результатов количественного исследования, результатах для контролей количественного ПЦР-исследования и возможные ошибки приведены в инструкции по применению набора реагентов АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL.

## СООБЩЕНИЯ ОБ ОШИБКАХ ОПЕРАТОРА ПО

1. Если отсутствует какой-либо калибратор или данные прибора, ПО выдает сообщение:



при этом, если отсутствуют данные прибора для калибраторов в столбце **Результат** дополнительно выводится сообщение **Сбой!**

Необходимо проверить наличие значений  $C_t$  для калибраторов, а также правильность их названия.