Организация-производитель

Место производства (1)

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»

_____ В.Ю. Дмитровский

«12» октября 2020 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ С.П. Левичев

«12» октября 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для скринингового исследования микрофлоры урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР® СКРИН)

Место производства (2)

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ А. Самарин

«12» октября 2020 г.

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «НПО ДНК-Технология»
ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.
ПОДПИСЬ

2020

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

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторная диагностика в практике врачей акушеров-гинекологов и дерматовенерологов играет важную роль, поскольку в последнее время особенностью урогенитальные инфекций, в том числе передаваемых половым путём, является малосимптомность клинических проявлений. В результате чего, пациентки поздно обращаются к врачу, нередко уже на стадии развития осложнений со стороны репродуктивной системы.

Современный диагностический арсенал врача-клинициста наряду с традиционными методами (микроскопия и бактериологический посев) включает также и молекулярно-биологические методы, что позволяет подобрать для каждого конкретного пациента оптимальный алгоритм обследования.

Возможности этиологической диагностики возбудителей инфекций, передаваемых половым путём (ИППП), значительно расширились с появлением в клинико-диагностических лабораториях метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), который в короткие сроки (1-2 дня) позволяет установить наличие или отсутствие генетического материала инфекционного агента в биологическом образце, взятом непосредственно из очага инфекции.

Следующим шагом в развитии лабораторной диагностики возбудителей инфекций стало появление приборов и технологий, позволяющих учитывать результаты ПЦР в автоматическом режиме. Такой вариант ПЦР позволяет, в отличие от более ранней, «классической» версии метода, определять количество нуклеиновых кислот искомых микроорганизмов.

Качественная и количественная оценка сложных микробных сообществ становится абсолютно необходимой для диагностики дисбиотических нарушений, причиной которых являются условно-патогенные микроорганизмы, которые в небольших количествах могут присутствовать в урогенитальном тракте у здоровых женщин.

При первичном обращении пациенток, на основании только клинических симптомов врачу часто бывает трудно провести дифференциальную диагностику инфекций, вызванных возбудителями ИППП, вирусами, грибами, и дисбиотических нарушений, которые являются следствием нарушения баланса между условно-

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

патогенными микроорганизмами и нормальной микрофлорой влагалища женщин репродуктивного возраста (лактобактериями).

Набор реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН позволяет оценить состояние микробиоценоза урогенитального тракта женщины репродуктивного возраста. Микробиоценоз оценивают путём сравнения количества нормальной микрофлоры (Lactobacillus spp.) с общей бактериальной массой (ОБМ). Отсутствие значимых различий между этими показателями (большая часть бактериальной массы представлена лактобактериями) свидетельствует о сохранности нормофлоры.

Значимое уменьшение количества лактобактерий относительно ОБМ, как правило, сопровождает ИППП или свидетельствует о дисбиотических нарушениях различной степени тяжести, при которых на фоне снижения нормальной микрофлоры увеличивается количество условно-патогенных бактерий.

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов для скринингового исследования микрофлоры урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР® СКРИН).

1.2 Набор реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН предназначен для выявления ДНК патогенных и условно-патогенных микроорганизмов с целью оценки состояния микрофлоры урогенитального тракта у женщин методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

1.3 Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН выпускается в следующих фасовках: стандартная (маркируется – S), для автоматизированного дозирования (маркируется – A).

Набор стандартной фасовки (фасовка – S) включает следующие компоненты:

Стандартная фасовка (S)		
Количество определений, шт.	24	
Наименование компонента	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы MAX	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.	

Набор фасовки для автоматизированного дозирования (фасовка – A) включает следующие компоненты:

Фасовка для автоматизированного дозирования (A)		
Количество определений, шт.	48	
Наименование компонента	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
Смеси для амплификации Стрим	2 стрипа по 8 пробирок	по 140 мкл
ПЦР-буфер Стрим-К	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноTaq MAX	2 пробирки	по 60 мкл
Буфер для разведения ДНК	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	2 пробирки	по 100 мкл
Принадлежности: Стрипы по 8 пробирок Крышки для стрипов	 10 шт. 2 шт.	 - -
Приведена фасовка для использования дозирующего устройства ДТстрим для дальнейшего проведения ПЦР на детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» (384 лунки).		

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

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН в стандартной фасовке рассчитан на 24 определения, в фасовке для автоматизированного дозирования – на 48 определений, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для стандартной фасовки набора реагентов методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина, для автоматизированной фасовки – модификацией полимеразы ТехноТаq MAX. Используемый подход исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В смеси для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации, включены флуоресцентные метки Fam, Hex, Rox и Cy5 (см. таблицу 1). Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно

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

регистрировать результаты нескольких разных реакций амплификации, одновременно проходящих в одной пробирке.

Для контроля расположения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора в одну из смесей для амплификации добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox. Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в термоблоке. После прохождения амплификации программа сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом, Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца.

В наборе реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН в несколько пробирок со смесями для амплификации добавлен внутренний контроль (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

Набор реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бактериальная масса, ОБМ), смесь, специфичную для лактобактерий (Lactobacillus spp.) и смеси, специфичные для патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Одна из смесей предназначена для амплификации геномной ДНК человека (контроль взятия клинического материала, КВМ). КВМ используется для исключения ошибок преаналитического этапа. В случае недостаточного для анализа количества взятого материала требуется повторное получение клинического материала.

Исследование с использованием набора реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР используют детектирующие амплификаторы «ДТпрайм[1]», «ДТлайт[2]» и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология).

После прохождения амплификации по показателю индикаторного цикла программно рассчитывается количество общей бактериальной массы, лактобактерий и каждого из условно-патогенных микроорганизмов. Для патогенных микроорганизмов проводится качественный анализ.

---

[1] только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6
[2] только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

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

Таблица 1 – Выявляемые набором ФЕМОФЛОР® СКРИН показатели, цветовая маркировка буфера и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки	Каналы детекции				Цветовая маркировка буфера
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	Общая бактериальная масса (ОБМ)	ВК	-	-	Голубой
2	Нормофлора – Lactobacillus spp.[1]	ВК	-	-	Бесцветный
3	Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp.	ВК	-	-	
4	Ureaplasma (urealyticum + parvum)	ВК	-	-	
5	Candida spp.	Контроль взятия материала	Маркер	-	
6	Mycoplasma hominis	ВК	Mycoplasma genitalium	-	
7	Trichomonas vaginalis	ВК	Neisseria gonorrhoeae	Chlamydia trachomatis	
8	Herpes simplex virus 2	ВК	Cytomegalovirus	Herpes simplex virus 1	

[1]Под spp. подразумевается широкая группа микроорганизмов, которая относится к данному роду, но может не соответствовать полностью роду в его систематическом понимании.

2.4 Время проведения анализа – от 2,5 ч включая этап пробоподготовки.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

При исследовании микрофлоры урогенитального тракта у женщин определяется количество условно-патогенных микроорганизмов в транспортной среде, пропорциональное общей обсемененности соответствующего биотопа. Для патогенных микроорганизмов проводится качественный анализ наличия ДНК.

3.1 Специфичность

Список выявляемых набором показателей представлен в таблице 1.

В образцах биологического материала, содержащих ДНК выявляемого показателя, во время проведения амплификации детектирующий амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемого показателя, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке отсутствует.

3.2 Аналитическая чувствительность

Для всех, кроме Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 – 10 000 копий/мл.

Для Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 – 2 000 копий/мл.

3.3 Контроль взятия материала

В образцах биологического материала, в которых присутствует геномная ДНК человека детектирующий амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке.

В образцах биологического материала, в которых отсутствует геномная ДНК человека, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке отсутствует.

3.4 Диагностическая чувствительность: 98-100%

3.5 Диагностическая специфичность: 100%

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Подготовку и проведение к ПЦР следует проводить в ПЦР-боксах.

Лабораторное оборудование и принадлежности, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

При работе с набором реагентов «в режиме реального времени» при удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) запрещается открытие пробирок, так как это может привести к разбрызгиванию содержимого и контаминации продуктами ПЦР оборудования, реагентов и лабораторной зоны.

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

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

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида компонентов, указанному в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности набора.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН необходимо оборудование и материалы, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 – Материалы, оборудование и реагенты

Оборудование и материалы	Вариант фасовки	
	S	A
ПЦР-бокс	да	да
Амплификатор детектирующий «ДТпрайм[1]»	да	да
Амплификатор детектирующий «ДТлайт[2]», ДТ-96	да	нет
Устройство дозирующее ДТстрим	нет	да
Устройство герметизирующее, например ДТпак	нет	да
Холодильник бытовой с морозильной камерой	да	да
Центрифуга с ускорением 13000 g	да	да
Микроцентрифуга-вортекс	да	да
Центрифуга для микропланшет ПЦР (384 лунки)	нет	да
Термостат твердотельный, поддерживающий температуру до 65 °С	да	да
Дозаторы электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объема одноканальные и сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10 мкл, 2,0-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 200-1000 мкл	да	да
Одноразовые наконечники с фильтром вместимостью 1,0-20 мкл, 1,0-200 мкл, 100-1000 мкл	да	да
Микропланешт ПЦР (384 лунки)	нет	да
Полимерная термопленка для медицинских целей	нет	да
Пробирки объёмом 1,5 мл	да	да
Перчатки одноразовые без талька	да	да
Штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да
Физиологический раствор (0,9 % NaCl) стерильный или транспортная среда для биопроб	да	да
Ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
Комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ)	да	да

[1] только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6
[2] только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют соскобы эпителиальных клеток из влагалища (заднебоковые своды), уретры, цервикального канала. Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС и ПРОБА-МЧ.

6.1 Взятие образцов соскобов эпителиальных клеток

Взятие соскобов эпителиальных клеток проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с 300 мкл стерильного физиологического раствора или в пробирки с транспортной средой.

6.1.1 Общие требования

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Исследование микрофлоры урогенитального тракта методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, то есть образец биоматериала анализируется на наличие и количество ДНК нормо- и условно-патогенной микрофлоры и на наличие ДНК патогенных микроорганизмов. Одновременно анализируется качество взятия биоматериала при помощи количественной оценки геномной ДНК человека.

6.1.2 Материал для исследований

Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию (влагалище, уретра, цервикальный канал) для оценки состояния урогенитальной микрофлоры принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

Женщины накануне обследования не должны проводить туалет половых органов и спринцевание.

Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и

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

минимальное количество слизи и примеси крови. Неправильное взятие биоматериала может привести к невозможности получения достоверного результата и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.

6.1.3 Особенности взятия материала из влагалища

Материал должен быть взят ДО проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить тёплым стерильным физиологическим раствором, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано. Соскоб берут с бокового или заднего нижнего свода влагалища.

У девочек взятие материала производят со слизистой оболочки преддверия влагалища, а в отдельных случаях - из заднего свода влагалища через гименальные кольца.

6.1.4 Особенности взятия материала из уретры:

- перед взятием биоматериала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5-2 часов;
- непосредственно перед взятием биоматериала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном (который можно смочить стерильным физиологическим раствором);
- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия биоматериала;
- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1-1,5 см, у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

6.1.5 Особенности взятия материала из цервикального канала:

- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5-1,5 см;
- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание стенок влагалища.

6.1.6 Порядок взятия материала в пробирку с транспортной средой

- Открыть крышку пробирки.

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

- С помощью одноразового зонда сделать соскоб эпителиальных клеток из соответствующего биотопа (влагалище, уретра, цервикальный канал).
- Перенести зонд с биоматериалом в пробирку с транспортной средой и тщательно прополощите его, избегая разбрызгивания жидкости.
- Извлечь зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удалить избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизировать.

При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторить процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

- Плотно закрыть крышку пробирки, промаркировать пробирку.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до начала исследования не должно превышать 24 часов.

Транспортировать и хранить образцы до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С.

В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала.

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК (пробоподготовку) проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ.

Примечание - При использовании для взятия биологического материала пробирок с реактивом ПРОБА-РАПИД выделение ДНК необходимо проводить только с использованием комплекта ПРОБА-НК-ПЛЮС.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с набором реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН можно узнать у представителя компании.

ВНИМАНИЕ! Комплект для выделения ДНК из биологического материала не входит в состав набора ФЕМОФЛОР® СКРИН.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор или транспортную среду для биопроб в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

7.2.1 Промаркируйте по одному стрипу со смесями для амплификации, запечатанными парафином для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (К+) и отрицательного контрольного образца (К-).

Примечание – Один стрип рассчитан на исследование одного образца.

Например, необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать по одному стрипу для двух исследуемых образцов, один стрип - «К+» и один стрип - «К-». Общее количество стрипов четыре.

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы MAX в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы MAX.

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

7.2.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (примерно 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

7.2.5 **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите в каждую пробирку стрипов для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК, закройте стрип крышкой. В стрипы маркированные «К+» и «К-» ДНК не вносится.

7.2.6 Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца из набора реагентов, закройте стрип крышкой.

7.2.7 Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К-», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего все этапы выделения ДНК, закройте стрип крышкой.

7.2.8 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.2.9 Установите все стрипы в блок детектирующего амплификатора. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока. Заполните протокол, используя параметр «Тест» в программном обеспечении для детектирующего амплификатора, укажите идентификаторы образцов.

Примечание – Для создания теста и проведения ПЦР должен быть загружен ini-файл «ФЕМОФЛОР СКРИН», поставляемый производителем.

7.2.10 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR согласно руководству по эксплуатации прибора. Программа амплификации приведена в таблице 3.

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

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм[1]», «ДТлайт[2]» и ДТ-96

	Температура, °С	Время		Режим оптических измерений	Количество циклов
		мин	с		
1	80,0	0	30		1
	94,0	1	30		
2	94,0	0	30		5
	64,0	0	15	√	
3	94,0	0	10		45
	64,0	0	15	√	
4	94	0	5		1
5	10	...	...		Хранение

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А[3]

7.3.1 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К и полимеразой ТехноТаq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Полимеразу ТехноТаq МАХ следует доставать из морозильника непосредственно перед использованием.

7.3.3 Добавьте в пробирку с ПЦР-буфером Стрим-К все содержимое второй пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К и двух пробирок с полимеразой ТехноТаq МАХ. Закройте крышку пробирки.

7.3.4 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразой ТехноТаq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

---

[1] только модели 4М1; 4М3; 4М6; 5М1; 5М3; 5М6; 6М1; 6М3; 6М6

[2] только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

[3] На примере использования дозирующего устройства ДТстрим (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) для дальнейшего проведения ПЦР на детектирующем амплификаторе.

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

Примечание – смесь ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТаq МАХ следует готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

7.3.5 Внесите аккуратно, без образования воздушных пузырей в восемь пробирок пустого стрипа, полученного в наборе по 140 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТаq МАХ.

7.3.6 Промаркируйте пустые стрипы, полученные с набором реагентов.

7.3.7 Внесите в каждую пробирку стрипов по 100 мкл буфера для разведения ДНК.

7.3.8 Добавьте аккуратно, без образования воздушных пузырей в соответствующие пробирки стрипов с буфером для разведения ДНК по 40 мкл анализируемых образцов, К+ и К-.

7.3.9 Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТаq МАХ, с разведенными образцами, К+ и К-, а так же пустые стрипы, микропланшет для ПЦР (384 лунки) на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации к прибору.

7.3.10 После завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим, аккуратно, не встряхивая, поместите микропланшет в подложку герметизирующего устройства ДТпак.

7.3.11 Проведите процедуру запечатывания микропланшет термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.12 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.3.13 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (384 лунки), заполните протокол, используя параметр «Тест» в программном обеспечении для детектирующего амплификатора, укажите идентификаторы образцов.

Примечание – Для создания теста и проведения ПЦР должен быть загружен ini-файл «ФЕМОФЛОР СКРИН», поставляемый производителем.

7.3.14 Запустите программу детектирующего амплификатора, согласно руководству по эксплуатации к прибору.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

8.2 Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.

8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. Анализ проводится автоматически программным обеспечением.

8.4 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название исследуемого показателя, результат по каждому показателю (количество и диаграмма, по которым можно судить о соотношении микроорганизмов в каждом из анализируемых образцов). Для Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 будет проведён качественный анализ. Пример приведен на рисунке 1.

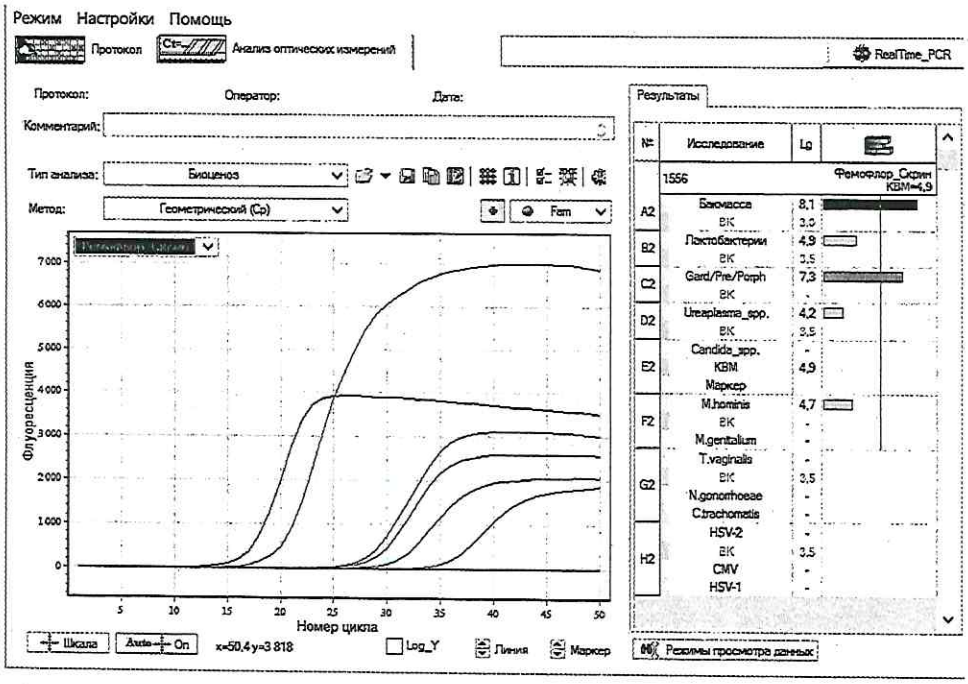


Рисунок 1 - Пример отображения результата исследования в окне программного обеспечения детектирующего амплификатора.

8.5 По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт (см. приложение А).

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

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом, Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца.

9.3 При наличии в исследуемом образце ДНК микроорганизмов, выявляемых набором ФЕМОФЛОР® СКРИН, в строке с названием микроорганизма указана цифра, обозначающая количество микроорганизма (десятичный логарифм концентрации), и гистограмма, в графическом виде отображающая количество данного микроорганизма и его соотношение с другими микроорганизмами.

Для Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 будет проведён качественный анализ и при наличии в исследуемом образце ДНК указанных наименований в таблице результатов будет отображён «+».

9.4 В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ). Значение КВМ меньше 4,0 следует интерпретировать как недостаточное количество материала. В этом случае может потребоваться повторное взятие клинического материала.

9.5 В положительном контрольном образце должен быть зафиксирован положительный результат: десятичный логарифм концентрации или «+». При получении отрицательных значений «–», результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.6 В отрицательном контрольном образце должен быть получен отрицательный результат «–» для специфического продукта и положительный результат для внутреннего контроля. При получении другого значения, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

10.2 Хранение

10.2.1 Набор реагентов следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX.

10.2.2 Полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

10.2.3 Смеси для амплификации, запечатанные парафином и смеси для амплификации Стрим следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора (за исключением полимеразы ТехноТаq MAX) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- смеси запечатанные парафином и смеси для амплификации Стрим следует хранить в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора;

- полимеразу ТехноТаq MAX - при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

10.3.3 Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.

10.4 Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и не использованные реактивы, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3. 2569-09.

11.2 Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

12.3 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

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

Приложение А

Пример отчета по исследованию с использованием набора реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН

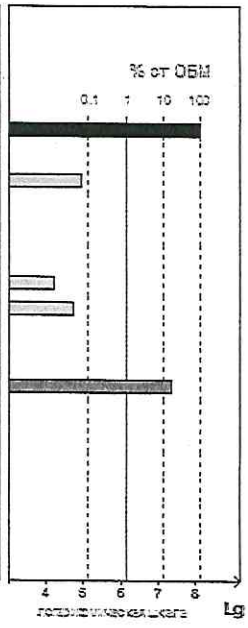
Логотип

Информация о лаборатории

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Идентификатор образца 1556

№	Название исследования	Результаты	
		Количественный	Относительный Lg(X/ОБМ)
	Контроль взятия материала	$10^{4.9}$ ☐	
1	Общая бактериальная масса	$10^{8.1}$ ☐	
	НОРМОФЛОРА		
2	Лактобактерии	$10^{4.9}$	-3.2 (<0.1%) ☐
	ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ		
3	Candida spp. *	не выявлено ☐	
	МИКОПЛАЗМА		
4	Ureaplasma spp. *	$10^{4.2}$ ☐	
5	M.hominis *	$10^{4.7}$ ☐	
6	M.genitalium **	не выявлено ☐	
	ОБЛИГАТНО-АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ		
7	Gard/Pref/Porph	$10^{7.3}$	-0.8 (14-19%) ☐
	ПАТОГЕНЫ		
8	T.vaginalis **	не выявлено ☐	
9	N.gonorrhoeae **	не выявлено ☐	
10	C.trachomatis **	не выявлено ☐	
11	HSV-2 **	не выявлено ☐	
12	CMV **	не выявлено ☐	
13	HSV-1 **	не выявлено ☐	



* Абсолютный анализ Lg(X)
** Качественный анализ

Заключение

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

Приложение Б

Символы, используемые при маркировке набора реагентов

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ФЕМОФЛОР® СКРИН следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:
ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6. тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный), E-mail: hotline@dna-technology.ru.

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании: «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/.

Ведущий научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук — Е.В. Гончарова

«12» октября 2020 г.

СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» — П.К. Варнавичус

«19» 11 2020 г.

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