ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
ЭНТЕРОФЛОР® Дети

Организация-производитель
Место производства (2)

СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин
«18» апреля 2022 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»

С.П. Левичев
«18» апреля 2022.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов
для исследования состава микробиоты толстого кишечника
в образцах кала детей методом ПЦР в режиме реального времени
(ЭНТЕРОФЛОР® Дети)

Место производства (1)
СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»

В.Ю. Дмитровский
«13» апреля 2022 г.

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-Технология ТС»
САМАРИН С.А.
ПОДПИСЬ

2022 г.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОБМ	- общая бактериальная масса
ИВ	- интерферирующие вещества
НК	- нуклеиновые кислоты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ВК	- внутренний контроль
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец

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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов:** Набор реагентов для исследования состава микробиоты толстого кишечника в образцах кала детей методом ПЦР в режиме реального времени (ЭНТЕРОФЛОР® Дети), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 **Назначение:** Набор реагентов предназначен для определения ДНК кишечно-ассоциированных микроорганизмов (отделы *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Euryarchaeota*), в том числе грибов рода *Candida*, а также гена метициллинрезистентности *Staphylococcus* spp. (mecA), *Cl.difficile* с генами энтеротоксинов A и B (tcdA, tcdB), Str.agalactiae с геном инвазивности (srr2) методом ПЦР в режиме реального времени в препаратах ДНК, полученных из образцов кала детей, с целью определения качественного состава и количественной оценки микробиоты толстого кишечника.

1.3 **Функциональное назначение:** диагностика *in vitro*.

1.4 **Показания к проведению исследования:** необходимость определения качественного состава и количественной оценки микробиоты толстого кишечника в ходе проведения лечебно-диагностических мероприятий.

Исследование рекомендовано проводить не ранее, чем через два дня после окончания приёма энтеросорбентов, про- и пребиотиков.

Противопоказаний к применению нет.

1.5 **Популяционные и демографические аспекты:** целевая группа пациентов – дети до 14 лет.

1.6 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов ЭНТЕРОФЛОР® Дети выпускается в стандартной фасовке (маркируется «Фасовка S, стрипы») и в фасовке для автоматизированного дозирования (маркируется «Фасовка А»).

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P815-S3/6, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип № 1	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под белым воскообразным слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип № 2	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под белым воскообразным слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	320 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

REF R1-P815-XA/5, фасовка А			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации Стрим	Прозрачная голубая или светло-розовая жидкость	2 стрипа по 8 пробирок	по 120 мкл
ПЦР-буфер Стрим-К	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноТаq МАХ	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 60 мкл
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	100 мкл
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.		
Крышки для стрипов	2 шт.		

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

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

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 12 определений для фасовки S и 24 определения для фасовки А (одна постановка на 24 образца или две постановки по 12 образцов), включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; количественный мультиплексный анализ. Результат исследования выражен десятичным логарифмом количества геном-эквивалентов микроорганизмов и факторов патогенности или резистентности в 1,0 г клинического материала (кала).

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Для фасовки S «горячий» старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина. «Горячий» старт для фасовки А обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С в течение 5 минут. Наличие «горячего старта» 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 образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов определяемых микроорганизмов, включены флуоресцентные метки Fam, Rox и Cy5.

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

В наборе реагентов в состав всех смесей для амплификации добавлен внутренний контроль (ВК), предназначенный для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В состав смеси для амплификации в пробирке № 1 стрипа 1 (канал Fam) входит смесь для определения значения lg ОБМ, которое позволяет установить, достаточно ли полученного количества ДНК для проведения анализа.

Для контроля расположения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора, в смеси для амплификации пробирки № 1 стрипа 1 и пробирки № 2 стрипа 2 добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора. После прохождения амплификации программа сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом несоответствии.

Перечень показателей, определяемых набором реагентов, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая маркировка смесей приведены в таблице 1.

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

Таблица 1 – Выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

Тип стрипа	№ пробирки в стрипе	Канал детекции				Цветовая маркировка смеси
		Fam	Hex	Rox	Cy5	
«Стрип №1»	1	ОБМ	ВК	Маркер	*Candida* spp.	Голубая
	2	*Bacteroides* spp.	ВК	*Lactococcus lactis*	*Bifidobacterium* spp.	Бесцветная (фасовка S)/ светло-розовая (фасовка А)
	3	*Faecalibacterium prausnitzii*	ВК	*Bif.adolescentis*	*Dialister* spp./ *Allisonella* spp./ *Megaspherae* spp./ *Veillonella* spp.	
	4	*Methanobrevibacter* spp.	ВК	*Bif. longum* subsp.*infantis*	*Parabacteroides spp.*	
	5	*Akkermansia muciniphila*	ВК	*Bif. longum* subsp.*longum*	*Butyricimonas* spp.	
	6	*Desulfovibrio* spp.	ВК	*Bif.bifidum*	*Coriobacteriia*	
	7	*Clostridium leptum gr.*	ВК	*Candida albicans*	*Lactobacillaceae*	
	8	*Lachnospiraceae*	ВК	*Bif. catenulatum* subspp.	*Clostridium difficile gr.*	
«Стрип №2»	1	-	ВК	*Enterococcus spp.*	*Erysipelotrichaceae*	
	2	*E.coli*	ВК	*Маркер*	*Enterobacterales*	Голубая
	3	*Peptoniphilaceae*	ВК	*Bif. animalis subsp.lactis*	*Pseudomonas* spp.	Бесцветная (фасовка S)/ светло-розовая (фасовка А)
	4	*Alistipes* spp.	ВК	*Bif.dentium*	*Fusobacteriaceae*	
	5	*Prevotella* spp.	ВК	*Bif.breve*	*Clostridium perfringens gr.*	
	6	*Str.agalactiae*	ВК	srr2	*Streptococcus* spp.	
	7	*St. aureus*	ВК	mecA	*Staphylococcus* spp.	
	8	tcdA, tcdB	ВК	-	*Clostridioides difficile**	
В пробирках со смесями для амплификации фасовки S присутствует парафин						

* На основании молекулярно-биологического филогенетического анализа и фенотипических данных к 2015 году пересмотрена структура рода *Clostridium*, создан в том числе новый род *Clostridioides*, и *Clostridium difficile* перенесена в него как *Clostridioides difficile.* (Lawson P.A., Citron D.M., Tyrrell K.L., Finegold S.M. Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe.* 2016;40:95–99. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008.)

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

Определение десятичного логарифма (lg) концентрации (количество копий ДНК-мишени в 1,0 мл препарата ДНК) проводится с использованием метода сравнения пороговых циклов, также называемым методом ΔΔCt. Преимуществом метода ΔΔCt является более точное определение соотношения количества ДНК-мишеней даже в условиях субоптимальной эффективности ПЦР без необходимости построения калибровочной кривой (Shefe J. H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and thenovel «gene expression's Ct difference» formula [Text] / J. H. Shefe, K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, T. Unger, H. Funke-Kaiser // J. Mol. Med. – 2006. – Vol. 84. – P. 901–910 [DOI 10.1007/s00109-006-0097-6]).

В расчёте учитывается значения порогового цикла (Ct) и эффективности амплификации. Пороговый цикл – это точка на оси абсцисс графика накопления продуктов в зависимости от номера цикла амплификации. Для нахождения порогового цикла используют метод Crossing point - определение максимума второй производной (Ср) (Ребриков и др., 2014). Эффективность ПЦР – это число, показывающее, во сколько раз за один цикл амплификации изменится количество фрагментов ДНК.

Расчет проводится согласно формуле:

$$Log(NO_a) = Log(E) \times (Cp - Cp_a), \qquad (1)$$

где $N0_a$ – исходное количество копий ДНК-мишени в 1,0 мл препарата ДНК исследуемого образца;

E – эффективность ПЦР;

Ср – пороговый цикл для образца, содержащего единственную молекулу ДНК;

Cp_a - пороговый цикл для анализируемого образца.

Значения E и Ср являются константами, примерно равными 2 и 45 соответственно. При максимальном значении эффективности ПЦР, равном 2, и при наличии выявляемой ДНК в исследуемом образце количество целевого ампликона увеличивается в 10 раз (на 1lg) за 3,4 цикла амплификации. Точное значение этих параметров указывается с учётом копийности соответствующей мишени для каждого набора праймеров и зондов в программном обеспечении детектирующего амплификатора (см. Приложение В к Инструкции по применению).

Полное исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация с использованием набора реагентов ЭНТЕРОФЛОР® Дети.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 1,5 часов.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

В образцах исследуемого материала, содержащего ДНК выявляемых аналитов, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке по заявленным каналам детекции.

В образцах исследуемого материала, не содержащего ДНК выявляемых аналитов, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке по заявленным каналам детекции отсутствует или ниже фонового значения, но присутствует для внутреннего контроля (ВК) по каналу Hex.

Подтверждение аналитической специфичности набора реагентов проводилось на образцах ДНК из культур заявленных микроорганизмов, а также ДНК из культур близкородственных или потенциально присутствующих в клиническом образце в высокой концентрации (10^{10} КОЭ/мл) микроорганизмов: *Alistipes finegoldii, Alistipes ihumii, Allisonella histaminiformans, Anaerococcus* spp., *Anaerostipes hadrus, Anaerotruncus colihominis, Bacteroides ovatus, Clostridioides difficile N1, Clostridioides difficile N2, Clostridium hathewayi, Clostridium methylpentosum, Clostridium paraputrificum, Collinsella aerofaciens, Collinsella bouchesdurhonensis, Coprobacter fastidiosus, Coprococcus comes, Desulfovibrio piger, Dialister* spp., *Dorea formicigenerans, Dorea longicatena, Dorea* spp., *Drancourtella massiliensis, Eggerthella lenta, Eisenbergiella tayi, Enterocloster aldensis, Lactococcus lactis, Faecalibacterium prausnitzii, Fusobacterium mortiferum, Fusobacterium nucleatum, Fusobacterium ulcerans, Peptostreptococcus anaerobius, Anaerococcus vaginalis, Eubacterium limosum, Clostridium clostridioforme, Clostridium symbiosum, Bilophila wadsworthia, Sutterella massiliensis, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Campylobacter jejuni, Prevotella sp, Prevotella stercorea, Prevotella copri, Phascolarctobacterium faecium, Raoultibacter massiliensis, Ruminococcus gnavus, Ruminococcus* spp., *Slackia piriformis, Staphylococcus caprae, Sutterella wadsworthensis, Bacteroides fragilis, Bacteroides intestinalis, Bacteroides vulgatus, Parabacteroides merdae, Alistipes onderdonkii, Akkermansia muciniphila, Catenibacterium mitsuokai, Eubacterium biforme, Lactobacillus salivarius, Aerococcus viridans, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus oralis, Streptococcus pneumonia, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae N1, Streptococcus agalactiae N2, Butyricimonas virosa, Dialister invisus, Atopobium vaginae, Gordonibacter pamelaeae, Gordonibacter urolithinfaciens, Intestinimonas massiliensis, Megasphaera cerevisiae, Megasphaera* spp., *Methanobrevibacter smithii, Methanosphaera stadtmanae, Olsenella* spp., *Parabacteroides goldsteinii, Parasutterella*

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

excrementihominis, Blautia coccoides, Ruminococcus obeum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum subsp. longum, Bifidobacterium longum subsp. *infantis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis, Bifidobacterium dentium, Bifidobacterium pseudocatenulatum, Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium bifidum, Blautia wexlerae, Escherichia coli, Gardnerella vaginalis, Staphylococcus aureus* (с геном метициллинрезистентности mecA), *Staphylococcus aureus* (без гена метициллинрезистентности mecA), *Neisseria flava, Neisseria sicca, Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae*, Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, *Meyerozyma guilliermondii, Candida albicans, Pichia kudriavzevii, Saccharomyces cerevisiae, Candida auris, Candida tropicalis, Clavispora lusitaniae, Debaryomyces hansenii, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Malassezia spp., Malassezia furfur, Kluyveromyces marxianus*, и/или ДНК человека в концентрации до $1{,}0\times10^8$ копий/мл образца.

Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций для каждой специфической системы, входящей в состав набора реагентов, к аналитам, выявляемым другими специфическими системами набора реагентов, а также неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образцах ДНК других микроорганизмов и/или ДНК человека в концентрации до $1{,}0\times10^8$ копий/мл образца.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком полного ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. 2.3, 9.3).

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец нуклеиновой кислоты, отнесены следующие вещества: гемоглобин, билирубин, холестерин, триглицериды, слизь (муцин) и лекарственные препараты, оставшиеся в образце ДНК в результате неполного их удаления в ходе выделения ДНК из образца биоматериала, а также изопропиловый спирт и метилацетат, которые могут присутствовать в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в таблице ниже.

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

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Концентрация интерферирующих веществ
Эндогенные вещества		
Кал (фекалии)	Билирубин	684 мкмоль/л
	Холестерин	13 ммоль/л
	Гемоглобин	0,35 мг/мл
	Триглицериды	37 ммоль/л
	Муцин	20%
Экзогенные вещества		
Кал (фекалии)	Изопропиловый спирт	10%
	Метилацетат	10%
	Ибупрофен суппозитории	5%
	Эспумизан эмульсия	5%
	Виферон суппозитории	10%

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как слизь, кровь, местные лекарственные препараты, в том числе содержащиеся в ректальных свечах, удаляются в ходе выделения НК с использованием комплектов/наборов реагентов для пробоподготовки. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала.

3.3 Предел обнаружения

Пределы обнаружения микроорганизмов, выявляемых с помощью набора реагентов ЭНТЕРОФЛОР® Дети установлены путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО) и искусственных контрольных образцов фекальных суспензий с добавленной смесью культур выявляемых аналитов и представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Пределы обнаружения микроорганизмов, выявляемых с помощью набора реагентов ЭНТЕРОФЛОР® Дети

Название аналита	Пределы обнаружения (копий в амлификационной пробирке)	Пределы обнаружения (копий в 1 мл выделенной ДНК)	Пределы обнаружения (копий в 1 г кала)
Общая бактериальная масса (ОБМ)	25	5x10^3	1,5x10^5
Candida spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Bacteroides spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Lactococcus lactis	25	5x10^3	1,5x10^5
Bifidobacterium spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Faecalibacterium prausnitzii	25	5x10^3	1,5x10^5
Bif.adolescentis	25	5x10^3	1,5x10^5
Dialister spp., *Allisonella* spp., *Megaspherae* spp., *Veillonella* spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Methanobrevibacter spp.	25	5x10^3	1,5x10^5

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

Название аналита	Пределы обнаружения (копий в амлификационной пробирке)	Пределы обнаружения (копий в 1 мл выделенной ДНК)	Пределы обнаружения (копий в 1 г кала)
Bif. longum subsp.*infantis*	25	5x10^3	1,5x10^5
Parabacteroides spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Akkermansia muciniphila	25	5x10^3	1,5x10^5
Bif. longum subsp. *longum*	25	5x10^3	1,5x10^5
Butyricimonas spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Desulfovibrio spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Bif.bifidum	25	5x10^3	1,5x10^5
Coriobacteriia	25	5x10^3	1,5x10^5
Clostridium leptum gr.	25	5x10^3	1,5x10^5
Candida albicans	25	5x10^3	1,5x10^5
Lactobacillaceae	25	5x10^3	1,5x10^5
Lachnospiraceae	25	5x10^3	1,5x10^5
Bif. catenulatum subspp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Clostridium difficile gr.	25	5x10^3	1,5x10^5
Enterococcus spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Erysipelotrichaceae	25	5x10^3	1,5x10^5
E.coli	25	5x10^3	1,5x10^5
Enterobaterales	25	5x10^3	1,5x10^5
Peptoniphilaceae	25	5x10^3	1,5x10^5
Bif. animalis subsp. *lactis*	25	5x10^3	1,5x10^5
Pseudomonas spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Alistipes spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Bif.dentium	25	5x10^3	1,5x10^5
Fusobacteriaceae	25	5x10^3	1,5x10^5
Prevotella spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
Bif.breve	25	5x10^3	1,5x10^5
Clostridium perfringens gr.	25	5x10^3	1,5x10^5
Str.agalactiae	25	5x10^3	1,5x10^5
srr2	25	5x10^3	1,5x10^5
Streptococcus spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
St. aureus	25	5x10^3	1,5x10^5
mecA	25	5x10^3	1,5x10^5
Staphylococcus spp.	25	5x10^3	1,5x10^5
tcdA, tcdB	25	5x10^3	1,5x10^5
Clostridioides difficile	25	5x10^3	1,5x10^5

Предел обнаружения зависит от используемого комплекта/набора реагентов для выделения ДНК и конечного объёма элюции (разведения) выделенной ДНК. Указанные значения пределов обнаружения набора реагентов ЭНТЕРОФЛОР® Дети для культур микроорганизмов получены при выделении ДНК рекомендуемым набором реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-МЧ МАКС производства ООО «ДНК-Технология ТС» (объём элюции 300 мкл) и с использованием комплекта ПРОБА-НК-ПЛЮС производства ООО

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

«НПО ДНК-Технология» (объём элюции 300 мкл) с предобработкой набором реагентов ПРОБА-Л производства ООО «ДНК-Технология ТС».

3.4 Диапазон измерения от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г, что соответствует от 5 до 12 lg ГЭ/г[1]. Значения ниже 5 lg ГЭ/г учитываются как положительный качественный результат исследования («обнаружено»).

3.5 Коэффициент вариации результатов (%CV) – не более 20%.

3.6 Метрологическая прослеживаемость

К набору реагентов применяются требования метрологической прослеживаемости контрольных образцов (п.5.7 ГОСТ ISO 17511-2011). Для прослеживаемости концентрации в положительном контрольном образце используется метод МакФарланда (McFarland).

При проведении конечным потребителем рутинной методики определения концентрации ДНК каждого аналита в положительном контрольном образце значения lg должны находиться в интервале 5,0 – 7,0 lg ГЭ/г.

Неопределённость измерения составляет 0,4.

3.7 Диагностические характеристики

Показатель	Диагностические характеристики	
	Диагностическая чувствительность (%)	Диагностическая специфичность (%)
Akkermansia muciniphila	100% (95,26 – 100)	100% (96,61 – 100)
Alistipes spp.	100% (95,80 – 100)	100% (96,27 – 100)
Bacteroides spp.	100% (97,16 – 100)	100% (93,51 – 100)
Bifidobacterium adolescentis	100% (93,84 – 100)	100% (97,07 – 100)
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis*	100% (94,40 – 100)	100% (96,95 – 100)
Bifidobacterium bifidum	100% (95,44 – 100)	100% (96,52 – 100)
Bifidobacterium breve	100% (94,04 – 100)	100% (97,05 – 100)
Bifidobacterium catenulatum subspp.	100% (92,45 – 100)	100% (97,32 – 100)
Bifidobacterium dentium	100% (93,40 – 100)	100% (97,18 – 100)
Bifidobacterium longum subsp. infantis	100% (87,66 – 100)	100% (97,65 – 100)
Bifidobacterium longum subsp. *longum*	100% (96,34 – 100)	100% (95,70 – 100)
Bifidobacterium spp.	100% (97,79 – 100)	100% (81,47 – 100)
Butyricimonas spp.	100% (97,20 – 100)	100% (93,28 – 100)
Candida albicans	100% (66,37 – 100)	100% (97,90 – 100)
Candida spp.	100% (94,87 – 100)	100% (96,79 – 100)
Clostridioides difficile	100% (84,56 – 100)	100% (97,73 – 100)
Clostridium difficile gr	100% (97,63 – 100)	89,66% (72,65-97,81)
Clostridium leptum gr.	100% (97,36 – 100)	100% (92,13 – 100)
Clostridium perfringens gr.	100% (96,11 – 100)	100% (95,98 – 100)
Coriobacteriia	100% (97,26 – 100)	100% (92,89 – 100)

[1] Для различных видов бактерий максимальные концентрации культур, накопленных в чистом виде, не превышают 10^9-10^{12} в мл.(Ефимов В.В. Научно-методологические подходы к использованию электрокинетических свойств бактерий для индикации госпитальных штаммов // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8-1. – С. 68-72)

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

Показатель	Диагностические характеристики	
	Диагностическая чувствительность (%)	Диагностическая специфичность (%)
Desulfovibrio spp.	100% (95,94 – 100)	100% (96,15 – 100)
E. coli	100% (97,38 – 100)	100% (91,96 – 100)
Enterobaterales	100% (97,72 – 100)	100% (85,18 – 100)
Enterococcus spp.	100% (97,71 – 100)	100% (85,75 – 100)
Erysipelotrichaceae	100% (97,49 – 100)	100% (90,75 – 100)
Faecalibacterium prausnitzii	100% (96,76 – 100)	100% (94,94 – 100)
Fusobacteriaceae	100% (90,26 – 100)	100% (97,52 – 100)
Lachnospiraceae	100% (97,18 – 100)	100% (93,40 – 100)
Lactobacillaceae	100% (97,49 – 100)	100% (90,75 – 100)
Lactococcus lactis	100% (96,41 – 100)	100% (95,60 – 100)
mecA	100% (91,96 – 100)	100% (97,38 – 100)
Dialister spp./*Allisonella* spp./ *Megaspherae* spp./ *Veillonella* spp.	100% (97,52 – 100)	94,44% (81,34-99,32)
Methanobrevibacter spp.	100% (83,16 – 100)	100% (97,76 – 100)
Parabacteroides spp.	100% (96,76 – 100)	100% (94,94 – 100)
Peptoniphilaceae	100% (95,80 – 100)	100% (96,27 – 100)
Prevotella spp.	100% (96,15 – 100)	100% (95,94 – 100)
Pseudomonas spp.	100% (89,42 – 100)	100% (97,57 – 100)
srr2	100% (59,04 – 100)	100% (97,93 – 100)
Staphylococcus aureus	100% (93,02 – 100)	100% (97,24 – 100)
Staphylococcus spp.	100% (96,58 – 100)	100% (95,32 – 100)
Streptococcus agalactiae	100% (92,13 – 100)	100% (97,36 – 100)
Streptococcus spp.	100% (97,90 – 100)	100% (66,37 – 100)
tcdA tcdB	100% (69,15 – 100)	100% (97,89 – 100)

3.8 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Совпадение результатов исследования клинических образцов

Выявляемый показатель	Внутрисерийная воспроизводимость		Межсерийная воспроизводимость	
	Стандартное отклонение (не более)	Коэффициент вариации (не более), %	Стандартное отклонение (не более)	Коэффициент вариации (не более), %
ОБМ	0,21	2	0,28	3
Akkermansia muciniphila	0,14	2	0,28	4
Alistipes spp.	0,21	3	0,35	5
Bacteroides spp.	0,21	3	0,28	3
Bifidobacterium adolescentis	0,28	4	0,42	4
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis*	0,28	3	0,21	2
Bifidobacterium bifidum	0,28	3	0,21	3
Bifidobacterium breve	0,28	7	0,35	7
Bifidobacterium catenulatum subspp.	0,28	3	0,42	7
Bifidobacterium dentium	0,14	3	0,28	4
Bifidobacterium longum subsp. infantis	0,21	4	0,28	4
Bifidobacterium longum subsp. *longum*	0,21	2	0,35	4
Bifidobacterium spp.	0,28	3	0,35	4
Butyricimonas spp.	0,21	3	0,35	5
Candida albicans	0,14	3	0,14	2
Candida spp.	0,28	5	0,14	2
Clostridioides difficile	0,14	2	0,21	4
Clostridium difficile gr	0,28	7	0,21	3

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

Выявляемый показатель	Внутрисерийная воспроизводимость		Межсерийная воспроизводимость	
	Стандартное отклонение (не более)	Коэффициент вариации (не более), %	Стандартное отклонение (не более)	Коэффициент вариации (не более), %
Clostridium leptum gr.	0,21	4	0,35	4
Clostridium perfringens gr.	0,21	3	0,35	5
Coriobacteriia	0,21	3	0,35	4
Desulfovibrio spp.	0,14	2	0,28	5
E. coli	0,14	3	0,28	3
Enterobaterales	0,21	3	0,49	6
Enterococcus spp.	0,14	3	0,35	5
Erysipelotrichaceae	0,21	3	0,28	4
Faecalibacterium prausnitzii	0,28	3	0,28	4
Fusobacteriaceae	0,21	3	0,28	4
Lachnospiraceae	0,28	3	0,21	2
Lactobacillaceae	0,21	4	0,57	8
Lactococcus lactis	0,21	4	0,49	6
mecA	0,14	3	0,21	4
Dialister spp./*Allisonella* spp./ *Megaspherae* spp./ *Veillonella* spp.	0,21	3	0,28	4
Methanobrevibacter spp.	0,14	2	0,35	4
Parabacteroides spp.	0,42	5	0,49	6
Peptoniphilaceae	0,21	4	0,14	3
Prevotella spp.	0,28	4	0,42	5
Pseudomonas spp.	0,21	4	0,35	7
srr2	0,21	5	0,21	5
Staphylococcus aureus	0,14	3	0,28	4
Staphylococcus spp.	0,21	4	0,28	5
Streptococcus agalactiae	0,21	5	0,78	10
Streptococcus spp.	0,35	4	0,42	5
tcdA tcdB	0,14	3	0,14	2

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

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

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится выделение НК и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

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

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	**Наличие/отсутствие опасного компонента**		**Указание на риски**
	Фасовка S	Фасовка А	
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Нет опасных веществ	-	-
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ	-	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-	-
Смеси для амплификации Стрим	-	Нет опасных веществ	-
Полимераза ТехноТаq МАХ	-	Нет опасных веществ	-
ПЦР-буфер Стрим-К	-	Нет опасных веществ	-
Буфер для разведения ДНК	-	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец	**Азид натрия менее 0,1%**	**Азид натрия менее 0,1%**	является безопасным для конечного пользователя

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

Не использовать набор реагентов:

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

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, 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 ЭНТЕРОФЛОР® Дети требуются следующие оборудование и материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S	Фасовка A
ПЦР-бокс	да	да
детектирующий амплификатор планшетного типа: Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (модификации «ДТпрайм *М*»); Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228; Амплификатор детектирующий ДТ-96 по ТУ 9443-002-96301278-2007; ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01250	да	нет
Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (модификации «ДТпрайм *Х*»)	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да[1]	да
холодильник с морозильной камерой	да	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	нет
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	нет
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл	да	нет
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл, 1000 мкл	да	нет
штатив для дозаторов	да	нет
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, в варианте исполнения*М1	да	нет
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, в варианте исполнения*М4	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *М1 и *М4, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	да	да
устройство для запечатывания планшет ДТпак (ООО «НПО ДНК-Технология»)	нет	да
центрифуга с RCF не ниже 500 x g, с адаптером для микропланшетов	нет	да
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 384 лунки	нет	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
Набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала: - Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-МЧ МАКС по ТУ 21.20.23-106-46482062-2019 производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14391; - Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; - Набор реагентов для предобработки биоматериала лизоцимом при выделении ДНК (ПРОБА-Л), производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/16776		

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

В качестве исследуемого материала используют кал (фекалии, в том числе меконий) человека.

6.2 Общие требования

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.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу 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.

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

Для анализа используют пробы фекалий или мекония массой (объёмом) примерно 1,0–3,0 г (1,0–3,0 мл). Пробу переносят в специальный стерильный сухой флакон в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками.

После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов:

Образцы фекалий или мекония допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 3 суток.

Фекальная суспензия с глицерином:

- при температуре минус 20 °С — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С — длительно.

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

6.5 Подготовка материала для исследования

Фекалии или меконий – приготовление суспензии.

6.5.1 Перенесите в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с 1,0 мл стерильного физиологического раствора примерно 0,1-0,2 г (мл) фекалий. Тщательно ресуспендируйте содержимое пробирки на вортексе в течение 5-10 с.

6.5.2 При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к суспензии фекалий в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида, добавляют глицерин в конечной концентрации 10–15%. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30–40 минут.

6.5.3 Дальнейшая обработка суспензии проводится в соответствии с инструкцией к используемому набору/комплекту реагентов для выделения ДНК (7.1).

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из исследуемого материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать набор реагентов ПРОБА- МЧ МАКС производства ООО «ДНК-Технология ТС» или комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС производства ООО «НПО ДНК-Технология» (объём элюции 300 мкл) с обязательной предобработкой набором реагентов ПРОБА-Л производства ООО «ДНК-Технология ТС».

Выделение ДНК из исследуемого материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту/набору реагентов.

Контроль качества выделенной ДНК осуществляется в ходе ПЦР с помощью системы внутреннего контроля (ВК) (п. 9).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из исследуемого материала необходимо подготовить **отрицательный контрольный образец**, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего комплекта реагентов, в объёме, указанном в инструкции к комплекту/набору реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР.

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Фасовка S: Промаркируйте по одному стрипу №1 и по одному стрипу №2 со смесями для амплификации, запечатанными парафином, для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца «К-» и положительного контрольного образца «К+».

Пример: Необходимо проанализировать два образца. Для этого необходимо промаркировать четыре стрипа №1 и четыре стрипа №2 (всего 8 стрипов): по одному стрипу №1 и №2 для каждого из двух исследуемых образцов, один стрип №1 и один стрип №2 для «К-» и один стрип №1 и один стрип №2 для «К+». (таблица 3).

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

Таблица 3 – Пример маркировки стрипов и пробирок для проведения ПЦР

Образцы	№ стрипа	Идентификатор стрипа
Образец 1	1	«стрип №1»
	2	«стрип №2»
Образец 2	3	«стрип №1»
	4	«стрип №2»
К-	5	«стрип №1»
	6	«стрип №2»
К+	7	«стрип №1»
	8	«стрип №2»

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

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

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

7.2.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. Закрывайте стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в каждую пробирку соответствующих промаркированных стрипов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме стрипов, промаркированных «К+» и «К-»).

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

7.2.7 Внесите в каждую пробирку стрипов, промаркированных «К-», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.1).

7.2.8 Внесите в каждую пробирку стрипов, промаркированных «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца.

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

7.2.10 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «Enteroflor_Kiddy.ini»*. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. При выборе этих тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице А.1 (Приложение А).

* Примечание: Тест (Enteroflor_Kiddy.ini) для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТ-96» можно создать путем ввода параметров в соответствии с приложением В, или данный тест предоставляется производителем набора реагентов.

7.3 Фасовка А. Подготовка и проведение реакции полимеразной цепной реакции с использованием дозирующего устройства ДТстрим.

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации Стрим!

7.3.1 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ПЦР-буфер Стрим-К» и «Полимераза ТехноТаq МАХ» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе. Для проведения 24 определений единовременно используется две пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К и две пробирки с полимеразой ТехноТаq МАХ. Для проведения 12 определений единовременно используется одна пробирка с ПЦР-буфер Стрим-К и одна пробирка с полимеразой ТехноТаq МАХ.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.2 При использовании «Базового способа постановки» подготовьте раствор полимеразы ТехноТаq МАХ и исследуемые образцы ДНК согласно руководству по эксплуатации дозирующего устройства. При использовании «Интегрального способа постановки»

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

предварительной подготовки раствора полимеразы ТехноТаq МАХ и исследуемых образцов ДНК не требуется.

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

7.3.4 Встряхните пробирки с положительным и отрицательным контрольными образцами в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.5 При использовании «Базового способа постановки» установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, ориентируясь на цветовую маркировку смеси (первая пробирка Стрип №1 и вторая пробирка Стрип №2 отмечены голубым буфером), пробирки с подготовленным раствором полимеразы ТехноТаq МАХ, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом, а также новый микропланшет 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

7.3.6 При использовании «Интегрального способа постановки» установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, ориентируясь на цветовую маркировку смеси (первая пробирка Стрип №1 и вторая пробирка Стрип №2 отмечены голубым буфером), пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К, полимеразой ТехноТаq МАХ, буфером для разведения ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом, а также новый микропланшет 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

ВНИМАНИЕ! При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.7 Установите пробирки с образцами ДНК на рабочий стол ДТстрим в соответствии с выбранным, «базовым» или «интегральным», способом постановки, согласно руководству по эксплуатации дозирующего устройства.

7.3.8 Откройте стрипы со смесями для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.9 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.3.10 Проведите процедуру запечатывания микропланшет 384 лунки термопленкой согласно

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

инструкции к прибору ДТпак.

7.3.11 Центрифугируйте микропланшет 384 лунки при 500 x g в течение 30 с.

7.3.12 Поместите микропланшет 384 лунки в блок детектирующего амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «EnteroflorKiddy.ini»*. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 12 мкл. При выборе этих тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице А2 (Приложение А).

* Примечание: Тест (Enteroflor_Kiddy.ini) для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТ-96» можно создать путем ввода параметров в соответствии с приложением В, или данный тест предоставляется производителем набора реагентов.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция результатов осуществляется амплификатором детектирующим автоматически. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет 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, правильно расположив пробирки в термоблоке.

9.3 При анализе результатов необходимо учитывать значения общей бактериальной массы (ОБМ, пробирка № 1 стрипа 1, канал Fam) и внутреннего контроля (ВК, пробирки № 1-8 стрипов 1 и 2, канал Hex):

- Для контроля качества взятия исследуемого материала, используется показатель ОБМ, который также позволяет определить, достаточно ли полученного количества ДНК для проведения анализа. Значение ОБМ меньше 6,0 lg следует интерпретировать как недостаточное количество материала. В этом случае рекомендуется повторное выделение ДНК или повторное взятие материала для исследования (выполняется последовательно).
- Для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции используется ВК (внутренний контроль). Если ВК отсутствует в одной или нескольких пробирках стрипа, при отсутствии специфических положительных результатов в этих пробирках, результат исследования для данного образца считается недостоверным (нд). Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из клинического материала; ошибками преаналитического этапа, неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка полимеразной цепной реакции, либо повторное выделение препарата нуклеиновых кислот, либо повторное взятие клинического материала (выполняется

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

последовательно).

9.4 В образцах исследуемого материала, содержащих ДНК выявляемых аналитов, во время проведения амплификации программное обеспечение будет регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции по соответствующему каналу (Fam, Rox или Cy5) в соответствующей пробирке. В таблице в строке с названием соответствующего аналита будет указан результат исследования (десятичный логарифм количества геном-эквивалентов в 1,0 г кала (lgГЭ/г) и гистограмма).

9.5 В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемых аналитов, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке по заявленным каналам детекции будет отсутствовать или присутствовать ниже фонового значения, но присутствовать для внутреннего контроля (ВК) по каналу Hex. В таблице в строке с названием соответствующего аналита будет указан результат исследования («-»).

9.6 В пробирке № 1 стрипа 1 значения lg ≤4,5 по каналу Fam и lg ≤4,0 по каналу Cy5 не учитываются программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будут указаны результаты исследования («-»).

9.7 В пробирке № 2 стрипа 1 значение lg ≤4,0 по каналу Rox не учитывается программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будет указан результат исследования («-»).

9.8 В пробирке № 3 стрипа 1 значение lg ≤4,0 по каналу Cy5 не учитывается программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будет указан результат исследования («-»).

9.9 В пробирке № 4 стрипа 1 значение lg ≤4,0 по каналу Cy5 не учитывается программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будет указан результат исследования («-»).

9.10 В пробирке № 6 стрипа 1 значение lg ≤4,0 по каналу Cy5 не учитывается программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будет указан результат исследования («-»).

9.11 В пробирке № 7 стрипа 1 значения lg ≤4,0 по каналам Fam и Cy5 не учитываются программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будут указаны результаты исследования («-»).

9.12 В пробирке № 8 стрипа 1 значение lg ≤4,0 по каналу Fam не учитывается программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будет указан результат

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

исследования («-»).

9.13 В пробирке № 1 стрипа 2 значения lg ≤4,0 по каналам Rox и Cy5 не учитываются программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будут указаны результаты исследования («-»).

9.14 В пробирке № 2 стрипа 2 значения lg ≤4,0 по каналам Fam и Cy5 не учитываются программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будут указаны результаты исследования («-»).

9.15 В пробирке № 3 стрипа 2 значения lg ≤4,0 по каналам Fam и Cy5 не учитываются программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будут указаны результаты исследования («-»).

9.16 В пробирке № 4 стрипа 2 значение lg ≤4,0 по каналу Fam не учитывается программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будет указан результат исследования («-»).

9.17 В пробирке № 5 стрипа 2 значения lg ≤4,0 по каналам Fam и Cy5 не учитываются программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будут указаны результаты исследования («-»).

9.18 В пробирках № 6 и 7 стрипа 2 значения lg ≤4,0 по каналу Cy5 не учитываются программным обеспечением, и в таблице справа, в колонке «Результат (lg)» будут указаны результаты исследования («-»).

9.19 Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 4. В отрицательном контрольном образце значение lg ВК должно быть указано. В положительном контрольном образце значение lg ВК не учитывается.

9.20 При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

9.21 Количество ДНК-мишеней, определяемое в положительном контрольном образце, должно находиться в диапазоне, указанном в таблице 4. При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

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

Таблица 4 – Результаты исследования для отрицательного и положительного контрольных образцов

Тип стрипа	№ пробирки в стрипе	Выявляемый Показатель	К- (lg)	К+ (lg)
Стрип №1	1	ОБМ	не указано или ≤4,5	5,0-7,0
		Candida spp.	-	5,0-7,0
	2	*Bacteroides* spp.	-	5,0-7,0
		Lactococcus lactis	-	5,0-7,0
		Bifidobacterium spp.	-	5,0-7,0
	3	*Faecalibacterium prausnitzii*	-	5,0-7,0
		Bif.adolescentis	-	5,0-7,0
		Dialister spp.,*Allisonella* spp., *Megaspherae* spp.,*Veillonella* spp.	-	5,0-7,0
	4	*Methanobrevibacter* spp.	-	5,0-7,0
		Bif. longum subsp.infantis	-	5,0-7,0
		Parabacteroides spp.	-	5,0-7,0
	5	*Akkermansia muciniphila*	-	5,0-7,0
		Bif. longum subsp. longum	-	5,0-7,0
		Butyricimonas spp.	-	5,0-7,0
	6	*Desulfovibrio* spp.	-	5,0-7,0
		Bif.bifidum	-	5,0-7,0
		Coriobacteriia	-	5,0-7,0
	7	*Clostridium leptum gr.*	-	5,0-7,0
		Candida albicans	-	5,0-7,0
		Lactobacillaceae	-	5,0-7,0
	8	*Lachnospiraceae*	-	5,0-7,0
		Bif. catenulatum subspp.	-	5,0-7,0
		Clostridium difficile gr.	-	5,0-7,0
Стрип №2	1	*Enterococcus* spp.	-	5,0-7,0
		Erysipelotrichaceae	-	5,0-7,0
	2	*E.coli*	-	5,0-7,0
		Enterobaterales	-	5,0-7,0
	3	*Peptoniphilaceae*	-	5,0-7,0
		Bif. animalis subsp.lactis	-	5,0-7,0
		Pseudomonas spp.	-	5,0-7,0
	4	*Alistipes* spp.	-	5,0-7,0
		Bif.dentium	-	5,0-7,0
		Fusobacteriaceae	-	5,0-7,0
	5	*Prevotella* spp.	-	5,0-7,0
		Bif.breve	-	5,0-7,0
		Clostridium perfringens gr.	-	5,0-7,0
	6	*Str.agalactiae*	-	5,0-7,0
		srr2	-	5,0-7,0
		Streptococcus spp.	-	5,0-7,0
	7	*St. Aureus*	-	5,0-7,0
		mecA	-	5,0-7,0
		Staphylococcus spp.	-	5,0-7,0
	8	tcdA, tcdB	-	5,0-7,0
		Clostridioides difficile	-	5,0-7,0

По результатам исследования можно сформировать бланк ответа.

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

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

10.2.3 Смеси для амплификации, запечатанные парафином и смеси для амплификации Стрим следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

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

10.3 Указания по эксплуатации

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

10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора реагентов (за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ) следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;

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

- смеси для амплификации, запечатанные парафином и смеси для амплификации Стрим, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон	REF	Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
LOT	Серия набора реагентов		Нестерильно
	Дата изготовления		

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

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-2019 ЕСКД Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ ISO 17511-2011 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство (СРПП). Медицинские изделия.

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документа, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым документом).

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»,
ООО «ДНК-Технология ТС» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.
Адрес производителя: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.
Место производства:

1. ООО «НПО ДНК-Технология»: Россия, 142281, Московская обл. г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.
2. ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ЭНТЕРОФЛОР® Дети, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Старший научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология» Л.В. Огнева
«18» 04 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России
академик РАН, профессор Г.Т. Сухих
«18» 04 2022 г.

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

Приложение А

ПЦР с детекцией в режиме реального времени, программы амплификации

Таблица А.1 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм *М*», «ДТлайт», ДТ-96 (фасовка S)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

Таблица А.2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм *Х*» (фасовка А)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

Примечание- Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объём реакционной смеси и т.п.) в приборах серии ДТ, можно загрузить в виде готового файла с расширением ini (см. Приложение В).

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

Приложение Б (справочное)

Принципы интерпретации результатов исследования

Учет и регистрация проводятся программным обеспечением автоматически. В данном приложении изложены общие принципы интерпретации результатов.

Образцы	Канал детекции		Интерпретация результата
	Fam, и/или Rox, и/или Cy5	Hex	
	Результат (lg)		
1	Значение lg указано/не указано по одному или нескольким каналам	Значение lg не учитывается	Обнаружен/не обнаружен фрагмент ДНК аналита, определяемого по соответствующему каналу детекции[1].
2	Значение lg не указано по всем каналам	Значение lg указано	Не обнаружены фрагменты ДНК аналитов, определяемых по соответствующим каналам детекции.
3	Значение lg не указано по всем каналам	Значение lg не указано	Недостоверный результат[2]

[1] в строке с названием соответствующего аналита будет указан результат исследования (десятичный логарифм количества геном-эквивалентов в 1,0 г кала (lgГЭ/г));

[2] требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

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

Приложение В (справочное)

Параметры исследования, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующего амплификатора (программа RealTime входит в состав детектирующих амплификаторов)

1) «Тип анализа» - выбрать «Мультиплекс Q+»;
2) Указать количество пробирок в тесте – 16;
3) Указать объём реакционной смеси – 35 мкл;

4) В окне «Программа амплификации», ввести следующие параметры:

Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм *М*», «ДТлайт», «ДТ-96», фасовка S

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм *Х*», фасовка А

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

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

5) «Каналы детекции», внести следующие параметры

Тип стрипа	№ пробирки в стрипе	Канал детекции			
		Fam	Hex	Rox	Cy5
«Стрип №1»	1	ОБМ	ВК	Маркер	*Candida* spp.
	2	*Bacteroides* spp.	ВК	*Lactococcus lactis*	*Bifidobacterium* spp.
	3	*Faecalibacterium prausnitzii*	ВК	*Bif.adolescentis*	*Dialister* spp./ *Alisonella* spp./ *Megaspherae* spp./ *Vellonella* spp.
	4	*Methanobrevibacter* spp.	ВК	*Bif. longum* subsp.*infantis*	*Parabacteroides spp.*
	5	*Akkermansia muciniphila*	ВК	*Bif. longum* subsp.*longum*	*Butyricimonas* spp.
	6	*Desulfovibrio* spp.	ВК	*Bif.bifidum*	*Coriobacteriia*
	7	*Clostridium leptum gr.*	ВК	*Candida albicans*	*Lactobacillaceae*
	8	*Lachnospiraceae*	ВК	*Bif. catenulatum* subspp.	*Clostridium difficile gr.*
«Стрип №2»	1	-	ВК	*Enterococcus spp.*	*Erysipelotrichaceae*
	2	*E. coli*	ВК	*Маркер*	*Enterobacterales*
	3	*Peptoniphilaceae*	ВК	*Bif. animalis subsp.lactis*	*Pseudomonas* spp.
	4	*Alistipes* spp.	ВК	*Bif.dentium*	*Fusobacteriaceae*
	5	*Prevotella* spp.	ВК	*Bif.breve*	*Clostridium perfringens gr.*
	6	*Str.agalactiae*	ВК	spr2	*Streptococcus* spp.
	7	*St. aureus*	ВК	mecA	*Staphylococcus* spp.
	8	tcdA, tcdB	ВК	-	*Clostridioides difficile*

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

6) «Параметры амплификации», в окне дополнительных настроек внести коэффициенты и минимальные значения логарифма концентраций для каждого аналита

№	Канал детекции	Показатель	N-i	E_i	Min
1/1	Fam	ОБМ	44.8	3.4	4.5
1/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
1/3	Rox	Маркер	0	0	-
1/4	Cy5	*Candida* spp.	45.0	3.4	4.0
2/1	Fam	*Bacteroides* spp.	42.6	3.4	-
2/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
2/3	Rox	*Lactococcus lactis*	42.2	3.4	4.0
2/4	Cy5	*Bifidobacterium* spp.	43.4	3.4	-
3/1	Fam	*Faecalibacterium prausnitzii*	42.4	3.4	-
3/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
3/3	Rox	*Bif.adolescentis*	43.4	3.4	-
3/4	Cy5	*Megasphaera spp. /Veillonella spp. /Dialister spp./Allisonella spp.*	42.7	3.4	4.0
4/1	Fam	*Methanobrevibacter* spp.	44.0	3.4	-
4/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
4/3	Rox	*Bif. longum* subsp. *infantis*	43.4	3.4	-
4/4	Cy5	*Parabacteroides* spp.	42.2	3.4	4.0
5/1	Fam	*Akkermansia muciniphila*	43.4	3.4	-
5/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
5/3	Rox	*Bif. longum subsp.longum*	43.4	3.4	-
5/4	Cy5	*Butyricimonas* spp.	42.7	3.4	-
6/1	Fam	*Desulfovibrio* spp.	43.4	3.4	-
6/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
6/3	Rox	*Bif.bifidum*	43.4	3.4	-
6/4	Cy5	*Coriobacteriia*	44.0	3.4	4.0
7/1	Fam	*Clostridium leptum* gr.	45.0	3.4	4.0
7/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
7/3	Rox	*Candida albicans*	40.0	3.4	-
7/4	Cy5	*Lactobacillaceae*	42.3	3.4	4.0
8/1	Fam	*Lachnospiraceae*	42.7	3.4	4.0
8/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
8/3	Rox	*Bif. catenulatum* subsp.	43.4	3.4	-
8/4	Cy5	*Clostridium difficile* gr.	41.4	3.4	-
9/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
9/3	Rox	*Enterococcus* spp.	42.6	3.4	4.0
9/4	Cy5	*Erysipelotrichaceae*	42.0	3.4	4.0
10/1	Fam	*E.coli*	45.0	3.4	4.0
10/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
10/3	Rox	Маркер	0	0	-
10/4	Cy5	*Enterobacterales*	42.2	3.4	4.0
11/1	Fam	*Peptoniphilaceae*	43.4	3.4	4.0
11/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
11/3	Rox	*Bif. animalis* subsp.*lactis*	43.4	3.4	-
11/4	Cy5	*Pseudomonas* spp.	42.7	3.4	4.0
12/1	Fam	*Alistipes* spp.	44.0	3.4	4.0
12/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
12/3	Rox	*Bif.dentium*	43.4	3.4	-
12/4	Cy5	*Fusobacteriaceae*	42.7	3.4	-
13/1	Fam	*Prevotella* spp.	43.0	3.4	4.0
13/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
13/3	Rox	*Bif.breve*	43.4	3.4	-
13/4	Cy5	*Clostridium perfringens* gr.	41.2	3.4	4.0
14/1	Fam	*Str.agalactiae*	45.0	3.4	-

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

№	Канал детекции	Показатель	N-i	E_i	Min
14/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
14/3	Rox	spr2	45.0	3.4	-
14/4	Cy5	*Streptococcus* spp.	42.2	3.4	4.0
15/1	Fam	*St. aureus*	48.0	3.4	-
15/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
15/3	Rox	mecA	44.7	3.4	-
15/4	Cy5	*Staphylococcus* spp.	44.8	3.4	4.0
16/1	Fam	tcdA, tcdB	45.0	3.4	-
16/2	Hex	ВК	45.2	3.4	-
16/4	Cy5	*Clostridioides difficile*	45.0	3.4	-

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