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



_____ В.Г. Акимкин
«12» 04 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro

«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Аэробы-FL»

АмплиСенс®

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

IVD

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

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ 5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК 13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 15
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F) 16
СОСТАВ 16
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 16
А. Подготовка проб для амплификации 16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 18
В. Анализ и интерпретация результатов 19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ 23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 25
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 26

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
К1, К2	- ДНК-калибраторы
К–	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Аэробы-FL»** предназначен для количественного определения ДНК энтеробактерий (семейства *Enterobacteriaceae*), стафилококков (*Staphylococcus* spp.) и стрептококков (*Streptococcus* spp.) в биологическом материале (мазок со слизистой влагалища) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени», при диагностике инфекционно-воспалительных заболеваний урогенитального тракта женщин.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от женщин с подозрением на инфекционно-воспалительные заболевания урогенитального тракта.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

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

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

Количественное определение ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом

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

начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, *Ct*). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

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

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 4 реакции – амплификация участков ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 4 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	**FAM**	**JOE**	**ROX**	**Cy5**
ДНК-мишень	*Enterobacteri-aceae*	*Staphylococcus* spp.	*Streptococcus* spp.	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	*gene* 16S rRNA	*gene* 16S rRNA	*gene* 16S rRNA	искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

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

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплект реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Линейный диапазон измерения и аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл[1]	Линейный диапазон измерения, ГЭ/мл
Мазки со слизистой влагалища	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	ПЦР-комплект вариант FRT-100 F	*Enterobacteriaceae*	$2x10^3$	$1x10^4$ – $1x10^8$
				Staphylococcus spp.		
				Streptococcus spp.		

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

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов:

- ДНК человека в концентрации $5x10^7$ ГЭ/мл;
- ДНК следующих штаммов микроорганизмов из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) и клинических изолятов в концентрации $1x10^7$ ГЭ/мл: *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* ATCC® 14053, *HSV* 1 и 2 типа (вирус простого герпеса типы 1 и 2),

[1] Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в биологическом материале (мазок со слизистой влагалища), помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл.

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

CMV (цитомегаловирус).

При тестировании образцов ДНК микроорганизмов, относящихся к *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp., включая ДНК следующих штаммов из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) и клинических изолятов в концентрации не менее $7x10^7$ ГЭ/мл: *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 4990™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™ для каждой группы были получены положительные результаты только по каналу для детекции ДНК соответствующей группы микроорганизмов, и отсутствовали неспецифические результаты по другим каналам.

Информация об интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость, воспроизводимость и правильность

Повторяемость и воспроизводимость были определены путем тестирования модельных образцов биоматериала. Модельные образцы биоматериала были приготовлены разведением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК *Enterobacteriaceae, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. в концентрациях $1x10^4$, $1x10^6$ и $1x10^8$ ГЭ/мл в биологическом материале – мазки со слизистой влагалища, помещенные в транспортную среду с муколитиком (ТСМ). Для приготовления модельных образцов использовались пулированные образцы мазков со слизистой влагалища, в которых содержание ДНК определяемых набором реагентов групп бактерий не превышало $1x10^4$ ГЭ/мл. Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

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

Таблица 3

Повторяемость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Среднее количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Среднее стандартное отклонение (SD)	Средний коэффициент вариации (CV), %
Enterobacteriaceae	$1x10^4$	20	4,35	0,15	3,52
Staphylococcus spp.		20	4,38	0,16	3,62
Streptococcus spp.		20	4,37	0,16	3,63
Enterobacteriaceae	$1x10^6$	20	6,40	0,05	0,81
Staphylococcus spp.		20	6,20	0,02	0,33
Streptococcus spp.		20	6,42	0,04	0,56
Enterobacteriaceae	$1x10^8$	20	8,33	0,18	2,18
Staphylococcus spp.		20	8,37	0,17	2,00
Streptococcus spp.		20	8,35	0,15	1,80

Таблица 4

Воспроизводимость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Среднее количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Среднее стандартное отклонение (SD)	Средний коэффициент вариации (CV), %
Enterobacteriaceae	$1x10^4$	40	4,33	0,17	3,80
Staphylococcus spp.		40	4,35	0,16	3,72
Streptococcus spp.		40	4,35	0,16	3,69
Enterobacteriaceae	$1x10^6$	40	6,40	0,07	1,01
Staphylococcus spp.		40	6,20	0,04	0,71
Streptococcus spp.		40	6,42	0,05	0,72
Enterobacteriaceae	$1x10^8$	40	8,32	0,17	2,11
Staphylococcus spp.		40	8,36	0,17	1,99
Streptococcus spp.		40	8,36	0,14	1,68

Правильность была определена путем измерения количественного содержания ДНК трех определяемых групп бактерий в разведении стандартного образца предприятия с концентрацией $5x10^4$ ГЭ/мл.

Таблица 5

Правильность

Микроорганизм	Среднее количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Среднее установленное значение	Средняя систематическая погрешность (B), %
Enterobacteriaceae	100	4,77	4,70	1,49
Staphylococcus spp.	100	4,68	4,72	0,83
Streptococcus spp.	100	4,66	4,70	1,57

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей

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

инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[2], биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого,

[2] Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

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

поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514).
2. Зонд гинекологический универсальный (например, ЗГУ «ЦМ», ООО «ЦЕНТРМЕД», Россия (РУ № ФСР 2011/11331).
3. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания (РУ № ФСР 2009/05516).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

4. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183).
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

6. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100 F:
   а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – для приготовления реакционной смеси.
   б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой

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

(например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
10. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
11. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат мазки со слизистой влагалища.

Мазки со слизистой влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой из

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

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

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

Допускается хранение образцов материала в транспортной среде с муколитиком (ТСМ) до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 20 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы мазков со слизистой влагалища не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Влияние потенциально интерферирующих веществ было изучено на модельных образцах. Модельные образцы были приготовлены разведением стандартного образца предприятия содержащего ДНК *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Streptcoccus* spp. до концентрации $2x10^3$ и $2x10^4$ ГЭ/мл в реагенте ОКО (входит в состав комплекта реагентов для экстракции ДНК «ДНК-сорб-АМ») с добавлением и без добавления потенциально интерферирующих веществ.

Для оценки влияния высокой концентрации экзогенного

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

вещества использовали препараты: «Мирамистин» («Инфамед», Россия) (рег. № P N001926/01); «Хлоргексидина биглюконат», раствор для наружного применения 0,05% («Биоген НПЦ», Россия); «Клотримазол», крем 1% («Озон», Россия); «Метрогил», гель вагинальный (метронидазол 1%), («Юник Фармасьютикал Лабораториз», Индия); «Полижинакс», капсулы вагинальные («Иннотек Интернасиональ», Франция); «Макмирор комплекс», капсулы вагинальные (Polichem Srl, Италия); «Hasico For Women», гель-смазка («ЭМАНСИ», Россия); «Contex Silk», интимный гель-смазка силиконовый (Contex, Чехия), «Play Feel», гель-смазка для повышения чувствительности (Durex, Таиланд) в различных концентрациях (см. табл. 6). Концентрацию экзогенного вещества определяли как объем препарата к объему исследуемого образца. Максимальная концентрация экзогенного вещества соответствовала максимально возможному объему вагинального мазка, помещенного в транспортную среду, при заборе клинического материала зондами, рекомендованными к использованию.

Для оценки влияния эндогенных веществ использовали гликоген, гемоглобин, лактоферрин, муцин в различных концентрациях (см. табл. 6). Концентрации эндогенных веществ были определены с учетом литературных данных по изучению ингибиторов ПЦР. Самая высокая концентрация эндогенных веществ превышала в два раза концентрацию ингибирующих ПЦР веществ по литературным данным.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	65; 130; 260 мкг/мл	Не обнаружено
	Лактоферрин	1,25; 2,5; 5 мкг/мл	Не обнаружено
	Гликоген	30; 60; 120 мг/мл	Не обнаружено
	Муцин	50; 100; 150 мкг/мл	Не обнаружено
Экзогенные вещества	«Мирамистин»	4; 8; 16 % (объем препарата к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
	«Хлоргексидина биглюконат»		Не обнаружено
	«Клотримазол»		Не обнаружено
	«Метрогил»		Не обнаружено
	«Полижинакс»		Не обнаружено
	«Макмирор комплекс»		Не обнаружено
	«Hasico For Women»		Не обнаружено
	«Contex Silk»		Не обнаружено
	«Play Feel»		Не обнаружено

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

Отсутствие влияния изучаемых потенциально интерферирующих веществ гарантируется только при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ».

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Порядок работы с комплектом реагентов «ДНК-сорб-АМ» смотрите в инструкции к комплекту для экстракции.

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

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

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

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

Объем элюции – **100 мкл**.

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

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Количество*
ПЦР-смесь-FL ФлороЦеноз / Аэробы	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К1 АВ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 АВ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

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

1. Перемешать содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смеси-FL ФлороЦеноз / Аэробы, ПЦР-буфера-В,**

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

полимеразы (TaqF) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью вортекса.

2. Предварительно необходимо подготовить смесь **ПЦР-буфера-В** и **полимеразы (TaqF)**. Для этого содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (60 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-буфером-В (600 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование **110** образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь из расчета расходования на одну реакцию (см. Приложение 1):
   – **10 мкл ПЦР-смеси-FL ФлороЦеноз / Аэробы**,
   – **5 мкл ПЦР-буфера-В** и **полимеразы (TaqF).**
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

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

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

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7, 8)[3].

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного[4] и планшетного[5] типа

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

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

[3] Программы амплификации (табл. 7, 8) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.
[4] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN).
[5] Например, CFX 96 (Bio-Rad).

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

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа[4]			Приборы планшетного типа[5]		
	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

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

Примечание – Канал для флуорофора **Cy5.5** включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 4 каналам:

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

Таблица 9

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *Enterobacteriaceae*	ДНК *Staphylococcus* spp.	ДНК *Streptococcus* spp.	ДНК ВКО-FL

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

На основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 АВ и К2 АВ происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет числа копий ДНК-мишеней энтеробактерий, стафилококков или стрептококков для исследуемых и контрольных образцов.

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

Полученные значения используются для расчета количества геномных эквивалентов ДНК соответствующих микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исходного образца биологического материала, по формуле:

[Число копий] ДНК микроорганизмов x К = [Число геномных эквивалентов] на 1 мл (ГЭ/мл)

ВНИМАНИЕ! Коэффициент **К** для расчета результата в ГЭ/мл указан во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Полученные при расчете значения концентраций ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков отражают общее содержание данных микроорганизмов в исследуемом материале, помещенном в транспортную среду.

Если полученное значение составляет менее $1x10^4$ ГЭ/мл, то указывается результат «менее $1x10^4$ ГЭ/мл», если полученное значение составляет более $1x10^8$ ГЭ/мл, то указывается результат «более $1x10^8$ ГЭ/мл» (с учетом линейного диапазона набора).

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

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы значение *Ct* по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК энтеробактерий, стафилококков или стрептококков не определены или составляют менее 10^4 ГЭ/мл. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков не выявлена, если для данной пробы значение *Ct* для ДНК энтеробактерий, стафилококков или стрептококков отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5 определено значение *Ct* меньше граничного.

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

Результат ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
ОК	Экстракция ДНК	значение концентрации отсутствует или определено меньше граничного	значение концентрации отсутствует или определено меньше граничного	значение концентрации отсутствует или определено меньше граничного	определено значение *Ct* меньше граничного
К–	ПЦР	значение концентрации отсутствует или определено меньше граничного	значение концентрации отсутствует или определено меньше граничного	значение концентрации отсутствует или определено меньше граничного	значение *Ct* отсутствует
К1	ПЦР	определено значение *Ct*	определено значение *Ct*	определено значение *Ct*	определено значение *Ct*
К2	ПЦР	определено значение *Ct* меньше граничного	определено значение *Ct* меньше граничного	определено значение *Ct* меньше граничного	определено значение *Ct* меньше граничного

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

Возможные ошибки:

1. Для ДНК-калибраторов (K1, K2) значения порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX отсутствуют, или значение *Ct* для ДНК-калибратора K2 превышает граничное значение, или показатель эффективности **E** по графику стандартов меньше значения, указанного во вкладыше. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) рассчитанное значение концентрации (в ГЭ/мл) ДНК энтеробактерий или/и стафилококков, или/и стрептококков, превышает граничное значение, указанное во вкладыше. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF). ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ФлороЦеноз / Аэробы хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Запрещается потребителю использовать компоненты из разных серий наборов реагентов.

Медицинское изделие техническому обслуживаю и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru[6]

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных

[6] Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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

реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
УДП РФ — Е.В.Ржевская

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии	Σ	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Схема приготовления реакционных смесей

	Объем реагентов на указанное количество реакций, мкл	
Объем реагентов на одну реакцию, мкл	10,0	5,0
Количество исследуемых биологических образцов[7]	ПЦР-смесь-FL ФлороЦеноз / Аэробы[10]	Смесь ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF)
1	60	30
2	70	35
3	80	40
4	90	45
5	100	50
6	110	55
7	120	60
8	130	65
9	140	70
10	150	75
11	160	80
12	170	85
13	180	90
14	190	95
15	200	100
16	210	105
17	220	110
18	230	115
19	240	120
20	250	125
21	260	130
22	270	135
23	280	140
24	290	145
25	300	150
30	350	175

[7] Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки 4 контрольных реакций: К1, К2, ОК и К–.

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