«УТВЕРЖДАЮ»
Зам. директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

А.В. Горелов

«28» Октября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для диагностики бактериального вагиноза (определения концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae, Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК 10
ФОРМАТ FRT 11
- СОСТАВ 11
- ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 12
- ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 13
- ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 13
  - А. Подготовка пробирок для амплификации 13
  - А1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F 14
  - Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 15
- АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ 16

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 19
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ 20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 22

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БВ	- бактериальный вагиноз
КС	- коэффициент соотношения
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО BV– ПКО BV+	- положительные контрольные образцы этапа экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ТСМ	- транспортная среда с муколитиком
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
FC1, FC2	- ДНК-калибраторы
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL»** предназначен для диагностики бактериального вагиноза методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Набор реагентов позволяет оценить соотношение общего количества бактерий, лактобактерий и условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae*) во влагалищном биотопе; общее количество бактерий позволяет оценить адекватность забранного материала. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из отделяемого влагалища и соскоба эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища.

Соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий, соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus* spp. и условно-патогенной микрофлоры – *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, а также условно-патогенной микрофлоры и общего количества бактерий позволяют с высокой точностью диагностировать бактериальный вагиноз – заболевание, связанное с подавлением нормальной микрофлоры влагалища (*Lactobacillus* spp.) и заменой ее условно-патогенной (в том числе *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*).

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

Использование набора реагентов **«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL»** позволяет проводить динамические наблюдения за состоянием влагалищного биотопа и контролировать эффективность проводимой терапии.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания[1].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения состояния микробиоценоза влагалища (количественное определение ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в клиническом материале) основан на:

1) экстракции тотальной ДНК из клинического образца – соскоба эпителиальных клеток со слизистой влагалища или отделяемого влагалища, помещенных в 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)»;
2) одновременном проведении реакции амплификации (мультипрайм-ПЦР) участков ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, 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. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Для определения количества копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в стандартном объеме клинического образца используются количественные стандарты (калибраторы), позволяющие определить число копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в реакционной пробирке.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

[1] В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

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

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F.

Форма комплектации 1 предназначена для экстракции ДНК и амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». На этапе экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. На этапе экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл
Соскоб эпителиальных клеток боковых стенок влагалища	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	**«ДНК-сорб-АМ»**	**«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F**	$5x10^3$
Отделяемое влагалища	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	**«ДНК-сорб-АМ»**	**«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F**	$5x10^3$

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общую бактериальную ДНК. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результатов методом секвенирования фрагментов амплификации.

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

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *HSV* 1 и 2 типа, *CMV*, *HPV* и ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей 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, биологический материал, включая

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

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, 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[2]. 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

[2] Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

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

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.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм, не включающих комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»).

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

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы, включающей комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека (для всех форм):

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (флакон объемом 50 мл) (РУ № ФСР 2009/05514) – при работе с формами комплектации 1–3.
2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 2–3.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

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

4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплектами» вариант FRT-100 F, FRT-200 F – от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия, Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,1 мл:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) - при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. **Для проведения анализа используется только клинический материал, полученный от женщин**.

Материалом для исследования служит соскобное отделяемое влагалища (соскоб эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища). Получение материала следует производить с помощью универсального зонда или зонда-тампона на пластиковой основе в пробирку объемом 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)».

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

Отделяемое следует забирать в достаточном количестве. Погрузить рабочую часть зонда в вагинальное отделяемое задненижнего свода влагалища и, вращая зонд, провести по поверхности эпителия, максимально полно набирая материал на зонд.

Перенести зонд в пробирку с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)». Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить в области насечки и оставить в пробирке с транспортной средой. Недопустимо использование ножниц для отрезания рабочей части зонда. Цвет транспортной среды с муколитиком может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого). Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Возможно исследование самостоятельно забранного материала, проведенное согласно инструкции к «Комплекту для самостоятельного взятия мазка из влагалища для микроскопии и диагностики инфекций методом ПЦР».

Хранение вышеперечисленного **материала** до проведения исследования осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Перед проведением экстракции ДНК необходимо убедиться в том, что зонды оставлены в пробирках с исследуемым материалом, пробирки плотно закрыты, транспортная среда присутствует в пробирках с клиническим материалом в достаточном для поведения исследования объеме (не менее 500 мкл).

Перед проведением экстракции ДНК необходимо разморозить образцы (в случае, если они длительно хранились), затем тщательно встряхнуть пробирки, содержащие исследуемый материал, на вортексе и сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

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

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость[3]	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**FC1**	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	FC2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПКО BV+	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО BV-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая

[3] При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

контроли и калибраторы.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**FC1**	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки
	FC2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПКО BV+	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО BV-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

К комплекту реагентов также прилагаются:

1. Программное обеспечение «АмплиСенс ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» (в формате Microsoft® Excel) для обработки данных и получения результатов, входящее в состав ПО «АмплиСенс Флороценоз», на цифровом носителе или на официальном сайте Изготовителя.
2. Инструкция на бумажном носителе.
3. Вкладыш со значениями калибраторов и характеристиками контрольных образцов для данной серии набора реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в

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

режиме «реального времени».

- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов для диагностики бактериального вагиноза (определения концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

При работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

При работе с формами выпуска набора 1–3 для экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

В пробирку отрицательного контроля экстракции **(ОК)** вносится 100 мкл «**Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)**». В пробирку положительного контроля экстракции **(BV–)** вносится 90 мкл «**Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)**» и 10 мкл **ПКО BV–**; в пробирку положительного контроля экстракции **(BV+)** вносится 90 мкл «**Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)**» и 10 мкл **ПКО BV+**.
ВНИМАНИЕ! Добавления внутреннего контрольного образца не требуется!

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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.

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

А1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

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

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз;
- 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (60 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT (600 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 120 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Разморозить и встряхнуть на вортексе пробирку с **ПЦР-смесью-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз**, сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

Сделать расчет на необходимое число реакций для количественного определения ДНК, включающего тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1**. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **5 контрольных точек этапа амплификации: два ДНК-калибратора (FC1 и FC2) в двух повторах, и отрицательный контроль (ДНК-буфер)**.

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз и ПЦР-смеси-2-FRT с полимеразой (TaqF), приготовленной согласно п.1.

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

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

7. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
   б) **ДНК-калибраторы** – внести в каждую пробирку по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора **(FC1, FC2)**;
   в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (ОК)** – внести в пробирку 10 мкл ДНК, выделенной из «**Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)**»;
   г) положительный контроль экстракции **(BV–)** – в пробирку внести 10 мкл ДНК, выделенной из **ПКО BV–**;
   д) положительный контроль экстракции **(BV+)** – в пробирку внести 10 мкл ДНК, выделенной из **ПКО BV+** .

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала **«АмплиСенс-1»** (см. табл. 1, 2).

Таблица 1

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа[4]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	-	1
1 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
2 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	-	

[4] Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа[5]

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценци	Кол-во циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
3	95	5 с	-	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	-	

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis*;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Atopobium vaginae*;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Lactobacillus* spp.;
- по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК общего количества бактерий.

Характеристикой сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения кривой накопления флуоресценции и линии порога. Именно значения пороговых циклов анализируются программой автоматического учета результатов. На основании значений порогового цикла (*Ct*) (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне

[5] Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

пороговой линией) и, исходя из заданных значений калибраторов FC1, FC2, происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов для каждой серии набора реагентов указываются во вкладыше к ПЦР-комплекту и должны быть заданы в соответствующих ячейках программы автоматической интерпретации результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- Результат амплификации исследуемого образца по каналам **FAM/Green**, **JOE/Yellow**, **ROX/Orange**, **Cy5/Red** считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме «реального времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.
- Результат амплификации исследуемого образца по каналам **FAM/Green**, **JOE/Yellow**, **ROX/Orange**, **Cy5/Red** считается **отрицательным** в случае отсутствия кривой типичной S-образной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct*).
- Результат анализа образца считается **недостоверным** в случае отсутствия сигнала по каналу **Cy5/Red** или в случае, когда значение Конц.расч. по каналу **Cy5/Red** для исследуемого образца менее 1000 копий на реакцию.
- Результат анализа образца считается **невалидным** в случае отсутствия сигнала по каналу **Cy5/Red** (нет значения *Ct*) или в случае, когда значение Конц.расч. для исследуемого образца по каналу **ROX/Orange** превышает значение Конц.расч. по каналу **Cy5/Red более чем на 0,5 Lg**.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Конц.расч. для контрольных образцов указаны во вкладыше, прилагаемом к «ПЦР-комплекту».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, BV–, BV+, К– в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 3), а для калибраторов FC1 и FC2 определено значение *Ct*.

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

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу, копий/реакция			
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
ОК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
BV–	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение больше граничного	Определено значение больше граничного
BV+	Экстракция ДНК	Определено значение больше граничного	Определено значение больше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение больше граничного
K–	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
FC1, FC2	ПЦР	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расчет коэффициентов соотношений, на основании которых производится интерпретация полученных данных для исследуемых и контрольных образцов, расчет концентраций ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий, осуществляется автоматически с помощью программы «АмплиСенс Флороценоз / Бактериальный вагиноз-FL» согласно прилагаемой к ней инструкции. Алгоритм получения результатов описан в методических рекомендациях по применению набора реагентов для диагностики бактериального вагиноза (количественное определение ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 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. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз хранить в защищенном от света месте.

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

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.

Медицинское изделие техническому обслуживанию 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 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
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России — С.А. Богдан

[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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

	Объем реактивов на указанное количество реакций	
Объем реагентов на одну реакцию (мкл)	10,0	5,0
Число реакций для количественного определения (включая 3 контроля этапа экстракции)	ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз*	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)*
4	100	50
5	110	55
6	120	60
7	130	65
8	140	70
9	150	75
10	160	80
11	170	85
12	180	90
13	190	95
14	200	100
15	210	105
16	220	110
17	230	115
18	240	120
19	250	125
20	260	130
21	270	135
22	280	140
23	290	145
24	300	150
25	310	155
30	360	180

* Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек этапа амплификации ((2 ДНК-калибратора FC1, FC2 (по два повтора) и отрицательный контроль ДНК-буфер).

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		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

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: двадцать два лист

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора (Доверенность № 8 от 28.11.2018 г.)

«28» октября 2019 г. А.В. Горелов

М.П.

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