СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»

_____ В.Ю. Дмитровский
«27» февраля 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.А. Самарин
«27» февраля 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для количественной оценки нормобиоты, возбудителей бактериального вагиноза, условно-патогенных микоплазм и грибов рода *Candida* в репродуктивном тракте женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР®АльфаСкрин)

2025 г.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВК	- внутренний контроль
ГДЧ	- геномная ДНК человека
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
ДБА	- доля бактериального аналита
ДС	- диагностическая специфичность
ДЧ	- диагностическая чувствительность
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)
ОКБ	- общее количество бактерий
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКазы	- рибонуклеазы
УПМ	- условно-патогенные микроорганизмы

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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов**: Набор реагентов для количественной оценки нормобиоты возбудителей бактериального вагиноза, условно-патогенных микоплазм и грибов рода *Candida* в репродуктивном тракте женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР®АльфаСкрин), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 **Назначение:** набор реагентов предназначен для количественного определения ДНК представителей нормобиоты *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus* не-*iners,* условно-патогенных микроорганизмов *Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, Candida* spp., *Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Fannyhessea vaginae, Mobiluncus* spp., *Anaerococcus* spp./ *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp./ *Porphyromonas* spp./ *Prevotella* spp., *Sneathia* spp./ *Leptotrichia* spp./ *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./ *Veilonella* spp./ *Dialister* spp., BVAB1 /BVAB2/ BVAB3 в биологическом материале из репродуктивного тракта женщин (мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки влагалища, цервикального канала) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

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

1.4 **Показания к проведению анализа:**

- инфекционно-воспалительные заболевания репродуктивного тракта;
- нарушение репродуктивного здоровья (бесплодие, невынашивание беременности).

Противопоказаний к применению нет.

1.5 **Популяционные и демографические аспекты:** набор реагентов предназначен для обследования лиц женского пола по завершении пубертатного периода.

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: врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник).

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 выпускается в стандартной фасовке (маркируется - фасовка S) и в фасовках для автоматизированного дозирования (маркируются - фасовка А, фасовка А-TL).

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P818-S3/5, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная, розовая или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

REF R1-P818-XA/4, фасовка А			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации Стрим	Прозрачная бесцветная, розовая или голубая жидкость	2 стрипа по 8 пробирок	по 120 мкл
ПЦР-буфер Стрим	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноТаq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 60 мкл
Буфер для разведения НК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.		

[1] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

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

REF R1-P819-XA/4, фасовка A-TL			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации Стрим	Прозрачная бесцветная, розовая или голубая жидкость	2 стрипа по 8 пробирок	по 120 мкл
Буфер TL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 715 мкл
Полимераза TL-65	Сухое вещество белого или бежевого цвета	2 пробирки (лиофилизат)	
Буфер для разведения НК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.		

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

Комплектность:

– Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.
– Вкладыш (только фасовка S, стрипы) – 1 экз.
– Инструкция по применению – 1 экз.
– Паспорт – 1 экз.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 24 определений (не более 8 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке A и в фасовке A-TL рассчитан на проведение 48 определений (одна постановка на 48 образцов или две постановки по 24 образца), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; количественный и качественный мультиплексный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига

[1] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

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

праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей 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 реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах. «Горячий» старт для фасовки A и фасовки A-TL обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С. Это исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах.

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического 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 продуктов амплификации. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

Набор реагентов включает смеси для амплификации, специфичные для выявления ДНК лактобацилл, условно-патогенных микроорганизмов, а также для определения вспомогательных аналитов: ДНК всех бактерий (ОКБ - общее количество бактерий) и геномной ДНК человека (ГДЧ).

В состав смесей для амплификации (за исключением пробирок №1, №7) входит внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции в каждой отдельной пробирке.

Для контроля расположения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора в смеси для амплификации пробирки №2 добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Cy5.5 – «Маркер». Он используется прибором для определения положения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора. После прохождения амплификации программа сравнивает заданное оператором расположение маркера с его реальным положением, и, если находит несовпадение (при неправильном расположении стрипа), то предупреждает оператора об этом несоответствии. В этом случае необходимо проверить расположении стрипа в термоблоке (первая пробирка стрипа отмечена голубым буфером) и скорректировать идентификаторы пробирок в протоколе.

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

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов определяемых микроорганизмов, включены флуоресцентные метки: Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контроля (ВК), входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок и биоматериала, необходимого для проведения исследования, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В таблице 1 приведены выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации.

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

№ пробирки	Каналы детекции					Цветовая маркировка смеси для амплификации
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5	
1	*Lactobacillus* не-*iners*	*Lactobacillus iners*	-	ОКБ	*Gardnerella vaginalis*	Голубая
2	*Bacteroides* spp./ *Porphyromonas* spp./ *Prevotella* spp.	ВК	-	*Mobiluncus* spp.	Маркер	Бесцветная или розовая
3	*Anaerococcus* spp.	ВК	*Fannyhessea vaginae*	-	-	
4	*Sneathia* spp./ *Leptotrichia* spp./ *Fusobacterium* spp.	ВК	-	-	-	
5	*Megasphaera* spp./ *Veilonella spp./ Dialister* spp.	ВК	-	-	-	
6	BVAB1 / BVAB2/ BVAB3	ВК	-	-	-	
7	*Mycoplasma hominis*	*Ureaplasma urealyticum*	*Ureaplasma parvum*	ГДЧ	-	
8	*Candida* spp.	ВК	*Candida albicans*	*Peptostreptococcus* spp.	-	

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 определение 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]).

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

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 анализируемого образца;

Е – эффективность ПЦР;

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

Cp_a - пороговый цикл для анализируемого образца.

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

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК выявляемых аналитов, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительные результаты амплификации специфических продуктов в соответствующих пробирках по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала человека, не содержащих ДНК выявляемых аналитов, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательные результаты амплификации специфических продуктов в соответствующих пробирках по заявленным каналам детекции и положительный результат амплификации внутреннего контроля по каналу детекции Hex (за исключением пробирок без ВК, см. таблицу 1).

Аналитическая специфичность набора ФЕМОФЛОР®АльфаСкрин была оценена на панели микроорганизмов, определяемых набором реагентов, и микроорганизмах, нахождение которых возможно в образце биоматериала, с концентрацией микроорганизмов не менее $1{,}0 \times 10^6$ копий/мл. По результатам тестирования показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации.

Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций каждого компонента, входящего в состав набора реагентов, по отношению к другой мишени системы.

Таблица 2 - Микроорганизмы, использованные для оценки аналитической специфичности

Названия микрорганизмов		
Anaerococcus vaginalis	*Fusobacterium nucleatum*	*Mycoplasma genitalium*
Bacteroides fragilis	*Gardnerella vaginalis*	*Neisseria gonorrhoeae*
Bifidobacterium bifidum	*Haemophilus influenzae*	*Parvimonas micra*
Burkholderia cepacia	HSV 1	*Peptoniphilus asaccharolyticus*
BVAB1	HSV 2	*Peptostreptococcus anaerobius*
BVAB2	HPV 16	*Porphyromonas vaginalis*
BVAB3	HPV 18	*Prevotella copri*
Candida albicans	HPV 45	*Propionibacterium acnes*
Candida parapsilosis	Human herpesvirus 6	*Proteus mirabilis*
Chlamydia trachomatis	Human herpesvirus 8	*Pseudomonas aeruginosa*
Corynebacterium vaginale	*Lactobacillus crispatus*	*Sneathia vaginalis*
CMV	*Lactobacillus iners*	*Staphylococcus aureus*
Dialister invisus	*Lactobacillus jensenii*	*Streptococcus agalactiae*
Eggerthella lenta	*Lactobacillus mulieris*	*Treponema pallidum*
Escherichia coli	*Lactobacillus gasserii*	*Trichomonas vaginalis*
Enterobacter intestinihominis	*Leptotrichia massiliensis*	*Ureaplasma urealyticum*
Enterococcus faecalis	*Megasphaera cerevisiae*	*Ureaplasma parvum*
Epstein-Barr virus	*Mobiluncus curtisii*	
Fannyhessea vaginae	*Mycoplasma hominis*	

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

3.2. Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (недостоверных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

Потенциальные ингибиторы ПЦР и их максимальные концентрации, которые могут присутствовать в образце, и для которых оценивалось ингибирующее влияние на ПЦР, приведены в таблице.

Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивалось путём добавления потенциальных интерферентов в образцы биологического материала в концентрациях согласно таблице 3. Далее выполнялись процедура выделения ДНК и ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием набора реагентов ФЕМОФЛОР®АльфаСкрин. В результате испытаний подтверждено отсутствие влияния исследованных потенциальных ингибиторов на ПЦР, проводимую с использованием набора реагентов.

Таблица 3 - Интерференты, использованные для оценки их возможного ингибирования ПЦР

Исследуемый материал	Интерферент	Действующее вещество	Тип интерферента	Концентрация вещества в препарате ДНК
Мазки/соскобы из влагалища, цервикального канала	Цельная кровь	Гемоглобин	Эндогенный	0,1% v/v (0,35 мг/мл)
	Слизь	Муцин		10%
	Мирамистин®, 0,01% раствор	Бензилдиметил [3-(миристоил-амино) пропил] аммоний хлорид моногидрат	Экзогенный – местный антисептик	10% (0,001%)
	Хлоргексидина биглюконат 0,05% раствор	Хлоргексидина биглюконат		10% (0,005%)
	Изопропиловый спирт	Изопропиловый спирт	Экзогенный – компонент наборов для выделения ДНК	10% (100 мкл/мл)
	Метилацетат	Метилацетат		10% (100 мкл/мл)

3.3. Предел обнаружения

Предел обнаружения мишеней, определяемых набором реагентов, указанный в таблице ниже, установлен путем анализа лимитирующих разведений количественно охарактеризованных лабораторных контрольных образцов, содержащих векторы со специфическими последовательностями ДНК выявляемых аналитов (с учетом копийности мишеневых генов), и подтверждён результатами, полученными на разведениях количественно охарактеризованных культур микроорганизмов.

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

ВНИМАНИЕ! Предел обнаружения зависит от объёма элюции наборов для выделения ДНК (чем больше объём элюции, тем выше предел обнаружения, что связано со снижением концентрации ДНК).

ДНК-мишени	Предел обнаружения ГЭ/мл с учетом копийности
Candida spp., *Candida albicans*	$5{,}0x10^2$
ОКБ, ГДЧ, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus* не-*iners*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Veilonella* spp., *Dialister* spp., BVAB1, BVAB2, BVAB3	$1{,}0x10^3$

3.4. Диапазон измерения, предел измерения

Диапазон измерения количественно определяемых аналитов, определяемых набором реагентов, находится в пределах от 1,0 x 10^4 до 1,0 x 10^9 ГЭ/мл, установлен путем анализа лимитирующих разведений количественно охарактеризованных контрольных образцов предприятия (с учетом копийности мишеневых генов), содержащих векторы со специфическими последовательностями ДНК выявляемых аналитов, подтвержден на разведениях количественно охарактеризованных культур микроорганизмов. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора реагентов, соответствует значению 1,0 x 10^4 для всех аналитов набора.

Коэффициент вариации (%CV) при определении предела измерения – не более 10%.

3.5. Метрологическая прослеживаемость

К набору реагентов применяются требования метрологической прослеживаемости контрольных образцов (ГОСТ Р ИСО 17511-2022). Для прослеживаемости концентрации в положительном контрольном образце используется метод спектрофотометрии. При выполнении конечным потребителем рутинной методики определения концентрации ДНК каждого аналита в положительном контрольном образце значения должны находиться в интервале 4.0-6,0 Lg коп/мл. Согласно ГОСТ Р ИСО 17511-2022 положительный контрольный образец является контрольным материалом правильности.

Неопределённость измерения составляет 0,4.

3.6. Диагностические характеристики

Диагностические характеристики набора реагентов, определяющего ДНК бактерий, человека, представителей нормобиоты *Lactobacillus iners, Lactobacillus не-iners,*

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

количественного определения ДНК условно-патогенных микроорганизмов *Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, Candida* spp., *Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Fannyhessea vaginae, Mobiluncus* spp., *Anaerococcus* spp. *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp. *Porphyromonas* spp. *Prevotella* spp., *Sneathia* spp. *Leptotrichia* spp. *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. *Veilonella* spp. *Dialister* spp., BVAB1, BVAB2, BVAB3 не устанавливаются в связи с тем, что все перечисленные аналиты могут присутствовать у здоровых женщин в репродуктивном тракте. Диагностическое значение имеет количество аналитов. Для количественных методик диагностические характеристики не применимы.

3.7. Точность измерений (повторяемость и воспроизводимость)

Повторяемость и воспроизводимость измерений с использованием набора реагентов оценивали путём тестирования модельного образца, приготовленного в матрице биологического материала в четырех концентрациях (предел обнаружения, предел измерения и двух значений в линейном диапазоне – $1{,}0 \times 10^6$ и $1{,}0 \times 10^9$). Каждый образец проходил все этапы исследования (выделение ДНК, амплификацию и детекцию результатов).

Повторяемость измерений была исследована с каждой из четырех концентраций, в каждой из фасовок (S, A, A-TL), на одном приборе (для фасовки S – «ДТпрайм 5М*», для фасовок A, A-TL -«ДТпрайм 5Х*»), одним оператором, в течение 5 дней, по 2 постановки в день, в двух повторах в каждой постановке. Для постановки было использовано по одной серии набора реагентов для каждой фасовки.

Коэффициент вариации при исследовании повторяемости измерений для концентрации «предел обнаружения» составил не более 20%, для всех концентраций в линейном диапазоне – не более 10% для всех вариантов фасовок.

Воспроизводимость измерений была исследована с каждой из четырех концентраций, в каждой из фасовок (S, A, A-TL). Для фасовки S постановки осуществлялись на двух моделях приборов («ДТпрайм 5М*», «ДТлайт 5S*»), на двух приборах каждой модели, для фасовок A, A-TL – на одной модели («ДТпрайм 5Х*») на трёх приборах. Для постановки были использованы по 2 серии наборов реагентов каждой фасовки. Постановку выполняли 2 оператора в 2 разных дня.

Коэффициент вариации при исследовании воспроизводимости измерений для концентрации «предел обнаружения» составил не более 20%, для всех концентраций в линейном диапазоне – не более 10% для всех вариантов фасовок.

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 ИСО 15190-2023, 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 санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные 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 санитарными правилами и нормами 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, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм 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 A	Фасовка A-TL	
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	Нет опасных веществ	-
ПЦР-буфер Стрим	-	Нет опасных веществ	-	-
Полимераза ТехноТаq MAX	-	Нет опасных веществ	-	-
Буфер для разведения НК	-	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	-
Буфер TL	-	-	Нет опасных веществ	-
Полимераза TL-65	-	-	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец	**Азид натрия менее 0,1%**	**Азид натрия менее 0,1%**	**Азид натрия менее 0,1%**	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен.

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

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, 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 требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S	Фасовка A, Фасовка A-TL
ПЦР-бокс	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени[1]	да	да[2]
микроцентрифуга-вортекс	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да
холодильник или холодильная камера	да	да
морозильная камера	нет	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные переменного объёма, позволяющие отбирать объём жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да
наконечники одноразовые с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да
штатив для дозаторов	да	да
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 в варианте исполнения *М4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту - ДТстрим	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	да
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	да
центрифуга с адаптером для микропланшетов, с RCF(g) не ниже 100	нет	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов	нет	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
транспортная среда, рекомендуются[3]:		

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

- Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640; - Транспортная среда для биопроб с муколитиком (СТОР-М)[4] по ТУ 21.20.23-102-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2019/9453 Валидированы следующие среды для жидкостной цитологии: - PreservCyt®, Hologic Inc., США, РУ № ФСЗ 2012/11752; - BD SurePath™ Liquid-Based Pap Test, "Бектон Дикинсон энд Компани", США, РУ № РЗН 2013/1335; - CellPrep, CP Biodyne, Ю.Корея, РУ № ФСЗ 2010/07117; - EASYPREP, YD Diagnostics, Ю.Корея, РУ № РЗН 2021/14717; - Cell Preservative Solution, Human Lituo Biotechnology Co.Ltd, Китай, РУ № РЗН 2022/17203
- Зонды медицинские по ТУ 9436-002-98349125-2016 в вариантах исполнения: тип А, А1, производство ООО «Медицинские изделия», Россия, РУ № РЗН 2018/7058 устройство для самозабора материала (при необходимости), рекомендуются: - Устройство для самостоятельного взятия пробы для лабораторной диагностики в гинекологии Qvintip (Квинтип), «Aprovix AB», Швеция, РУ №РЗН 2019/8249; - Устройство медицинское - Сваб-система Copan, "Копан Италия С.п.А.", Италия, РУ № ФСЗ 2010/07660
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала, рекомендуются: - Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; - Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в форме комплектации: ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08696; - Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ) по ТУ 9398-088-46482062-2016 в комплектации ПРОБА-МЧ-РАПИД, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2017/5753; - -Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС по ТУ 21.20.23-106-46482062-2019, ООО «ДНК- Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14391; - Набор реагентов для выделения ДНК/РНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека (ПРОБА-МЧ-РАПИД II) по ТУ 21.20.23-136-46482062-2023, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2024/23205.
Примечания к таблице: [1] - далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже [2] - валидирован детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм» 5Х*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 [3] – допускается использовать любые транспортные среды, предназначенные для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований и зарегистрированные на территории РФ в установленном порядке [4] – не рекомендуется для совместного применения с набором реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД II

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объёмом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 12 мкл (фасовка А, фасовка А-TL);

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

- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °С.

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм 5М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту - «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм 5Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке А; в фасовке А-TL), далее по тексту - «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм 5Х*»;
- Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт 5S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228, далее по тексту – «ДТлайт».

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Материал для исследования

Для исследования используют мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки влагалища, цервикального канала.

6.2. Общие требования

6.2.1 Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

6.2.2 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.

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

6.2.4 На этапах подготовки биоматериала и выделении из него нуклеиновых кислот используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

6.2.5 Для предотвращения контаминации всегда открывайте крышку только той пробирки, в которую будете вносить биологический материал, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой.

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, СанПиН 3.3686-21.

6.3. Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК может потребоваться подготовка образцов биологического материала (6.5).

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной в зависимости от источника биологического материала процедуре.

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

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1) и устройств для самозабора материала (при необходимости).

Ограничение метода[1]: местное применение лекарственных препаратов, использование лубрикантов, УЗИ вагинальным датчиком, кольпоскопия – менее чем за 24 часа до исследования.

6.3.1. Особенности взятия урогенитальных мазков/соскобов

Женщины накануне обследования не должны проводить туалет половых органов и спринцевание. Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови.

ВНИМАНИЕ! Перед получением мазка/соскоба эпителиальных клеток с заднего свода влагалища и цервикального канала свободно стекающее отделяемое необходимо удалить стерильным ватным тампоном.

6.3.2. Особенности взятия материала из влагалища

Материал должен быть взят до проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано. Соскоб берут с заднебокового свода влагалища.

6.3.3. Особенности взятия материала из цервикального канала

Перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором. Зонд вводят в цервикальный канал на глубину 0,5–1,5 см. При извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание стенок влагалища.

6.4. Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения мазков/соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища определяются инструкциями по применению рекомендуемых наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

[1] - если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектам реагентов для выделения НК

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

6.5. Подготовка биологического материала для выделения ДНК

Подготовка мазков/соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

Для образцов, взятых в среды BD SurePath™ Liquid-Based Pap Test и CellPrep, требуется предварительная подготовка с использованием Набора реагентов для предобработки биоматериала при выделении нуклеиновых кислот (ПРОБА-ПК), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ №РЗН 2021/14384, в соответствии с инструкцией по применению.

Для образцов, взятых в среды PreservCyt, EASYPREP и Cell Preservative Solution:

1. Тщательно перемешайте содержимое виалы с образцом в транспортной среде (растворе), интенсивно встряхнув виалу.
2. Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл 1,0 мл материала. Плотно закройте пробирку.
3. Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000-16000 в течение 3 мин.
4. Максимально полно удалите надосадочную жидкость.
5. Добавьте к осадку транспортную среду СТОР-Ф или стерильный физиологический раствор в объёме, указанном в инструкции к набору/комплекту реагентов для выделения ДНК, и ресуспендируйте осадок пипетированием.

В случае использования устройств для самозабора материала зонд переносится в пробирку с транспортной средой, предназначенной для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований. Дальнейшая подготовка проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1) или инструкцией по применению используемой транспортной среды.

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК из мазков/соскобов эпителия со слизистой оболочки влагалища, цервикального канала рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения на медицинское изделие и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД II, ПРОБА-МЧ МАКС.

Минимальное количество элюата при использовании вышеперечисленных наборов/комплектов реагентов составляет 300 мкл.

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору/комплекту реагентов или в соответствии с Приложением В (в случае использования сокращённой методики для комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения НК, в объёме, указанном в инструкции по применению набора/комплекта реагентов.

7.2. Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации.
2. Следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

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

Примечание – Один стрип рассчитан на исследование одного образца.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 стрипа для неизвестных образцов; один стрип для «К-» и один стрип для «К+». Общее количество стрипов – 6.

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

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

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 промаркированных стрипов по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте стрипы крышками.

7.2.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом (К+) на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС и ПРОБА-ГС-ПЛЮС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД и ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Необходимо закрывать 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 образцов препарата ДНК. В стрипы, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

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

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

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

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

7.2.10 Установите все стрипы в детектирующий амплификатор.

7.2.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (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	25[2]	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

[1] - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов.

[2] - допускается хранение при температуре 10 °С

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

7.3. Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А, фасовка А-TL с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм 5Х*»)

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать микропланшеты ПЦР 384 лунки, герметизируемые термоплёнкой.
2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.3.1. **Фасовка А.** Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим и полимеразой ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с. Для проведения 48 определений единовременно используются две пробирки с ПЦР-буфером Стрим и две пробирки с полимеразой ТехноТаq MAX. Для проведения 24 определений используются одна пробирка с ПЦР-буфером Стрим и одна пробирка с полимеразой ТехноТаq MAX.

Фасовка А-TL. Встряхните пробирки с буфером TL на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с. Центрифугируйте пробирки с буфером TL и полимеразой TL-65 на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с. Для проведения 48 определений единовременно используются две пробирки с буфером TL и две пробирки с полимеразой TL-65. Для проведения 24 определений используются одна пробирка с буфером TL и одна пробирка с полимеразой TL-65.

ВНИМАНИЕ!

1. Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
2. Для базового способа постановки требуется предварительная подготовка образцов ДНК и контрольных образцов (7.3.2, 7.3.7).

7.3.2. **При использовании базового способа постановки**:

Фасовка А. Подготовьте раствор полимеразы ТехноТаq MAX и анализируемые образцы ДНК согласно руководству по эксплуатации ДТстрим.

Фасовка А-TL. Подготовьте раствор полимеразы TL-65 и анализируемые образцы ДНК согласно руководству по эксплуатации ДТстрим.

7.3.3. **При использовании интегрального способа постановки:**

Фасовка А. Предварительной подготовки раствора полимеразы ТехноТаq MAX и анализируемых образцов не требуется.

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

Фасовка А-TL. Предварительной подготовки полимеразы TL-65 и анализируемых образцов не требуется.

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

7.3.5. **При использовании базового способа постановки:**

Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, ориентируясь на цветовую маркировку смеси (первая пробирка стрипа отмечена голубым буфером), пробирки с подготовленным раствором полимеразы ТехноТаq MAX или полимеразы TL-65, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим.

7.3.6. **При использовании интегрального способа постановки:**

Фасовка А. Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, ориентируясь на цветовую маркировку смеси (первая пробирка стрипа отмечена голубым буфером), пробирки с ПЦР-буфером Стрим, полимеразой ТехноТаq MAX, буфером для разведения НК, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим.

Фасовка А-TL. Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, ориентируясь на цветовую маркировку смеси (первая пробирка стрипа отмечена голубым буфером), пробирки с буфером TL, полимеразой TL-65, буфером для разведения НК, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим.

7.3.7. Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением подготовки (при необходимости) и дозирования для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС и ПРОБА-ГС-ПЛЮС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД и ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом

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

ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.3.8. Установите неизвестные образцы ДНК, отрицательный контрольный образец и положительный контрольный образец на рабочий стол ДТстрим.

7.3.9. Откройте стрипы со смесями для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную фольгу.

7.3.10. Проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.11. Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.3.12. Проведите запечатывание микропланшета ПЦР термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.3.13. Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.3.14. Поместите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.

7.3.15. Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

[1] - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов.

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

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (фасовка А, фасовка А-TL)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25[1]	…	…	Хранение		Хранение
√- режим оптических измерений						

[1] - допускается хранение при температуре 10 °С

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Учет результатов амплификации 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, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. В этом случае необходимо проверить расположение стрипов в термоблоке (пробирка №1 стрипа отмечена голубым буфером) и скорректировать идентификаторы пробирок в протоколе.

9.3. При анализе результатов необходимо учитывать значения контрольных показателей (ОКБ, пробирка №1 стрипа, канал детекции Cy5; ГДЧ, пробирка №7 стрипа, канал детекции Cy5) и внутреннего контроля (ВК, пробирки №№ 2-6, 8 стрипа, канал детекции Hex):

9.3.1 Для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции используется ВК (отсутствует в пробирках №1, №7 стрипа). При отрицательных результатах, полученных в одной пробирке одновременно для ВК по каналу детекции Hex и для выявляемых аналитов по соответствующим каналам детекции (за исключением пробирок без ВК), результат исследования для данного образца считается недостоверным (нд).

Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие биологического материала у пациента (выполняется последовательно).

9.3.2 По показателям ОКБ и ГДЧ определяется достаточность количества биоматериала для оценки количества нормобиоты и УПМ.

9.4. В образцах исследуемого биоматериала, содержащих ДНК выявляемых аналитов в концентрации выше порога обнаружения, но ниже порога измерения будет указано - «обнаружено, ниже порога измерения». В случае, если количество ДНК аналита

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

превышает порог измерения, результат будет представлен в виде Lg ГЭ/мл образца. Результат, полученный для ВК, в этом случае не учитывается.

9.5. В образцах исследуемого биоматериала материала, содержащих ДНК выявляемых аналитов, в концентрации ДНК ниже порога обнаружения будет указан отрицательный результат для соответствующих аналитов («-») и положительный результат для ВК (за исключением пробирок без ВК).

9.6. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов:

9.6.1 Для отрицательного контрольного образца должен быть получен отрицательный результат («-») для выявляемых аналитов по соответствующим каналам детекции и положительный результат для ВК (за исключением пробирок без ВК) по каналу детекции Hex.

При получении положительного результата для выявляемых аналитов для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считаются недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

9.6.2 Для положительного контрольного образца должен быть получен положительный результат (4,0-6,0 Lg Lg ГЭ/мл). Результат, полученный для ВК, в этом случае не учитывается.

При получении отрицательного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7. Интерпретация результата исследуемых образцов биоматериала состоит из следующих этапов:

- по показателям ОКБ и ГДЧ определяется достаточность количества биоматериала для оценки количества нормобиоты и УПМ (значения Lg ГЭ/мл для ОКБ и ГДЧ <3,0 для мазков/соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и значения Lg ГЭ/мл для ОКБ и ГДЧ <3,5 для мазков/соскобов со слизистой оболочки влагалища следует интерпретировать как недостаточное количество материала для такого анализа;
- по показателям нормобиоты *Lactobacillus iners, Lactobacillus* не-*iners,* условно-патогенных микроорганизмов *Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, Candida* spp., *Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Fannyhessea vaginae, Mobiluncus* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus*

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

spp., *Bacteroides* spp. *Porphyromonas* spp. *Prevotella* spp., *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Veilonella* spp., *Dialister* spp., BVAB1, BVAB2, BVAB3 результат может быть отрицательным в случае концентрации ДНК соответствующих аналитов ниже порога обнаружения или положительным в двух вариантах – «Обнаружено, ниже порога измерения» в случае, если концентрация ДНК ниже порога измерения, и в виде значения Lg ГЭ/мл образца в случае, если концентрация ДНК выше порога измерения;

- для количественной оценки представителей микробиоты проводится нормирование, то есть определение доли бактериального аналита (ДБА) в образце исследуемого биоматериала относительно общего количества бактерий (ОКБ) по формуле:

  ДБА= $〚10〛^{Lg(аналит)} / 〚10〛^{Lg(ОКБ)} \times 100\%$,

где Lg (аналит) и Lg (ОКБ) – значения Lg, полученные для искомого бактериального аналита и для ОКБ соответственно.

Для количественной оценки представителей микробиоты можно таким же образом определить долю групп бактерий (нормобиота, условно-патогенные анаэробные микроорганизмы, ассоциированные с бактериальным вагинозом, относительно общего количества бактерий).

В результате можно сделать вывод о доминировании или снижении доли нормальной микробиоты, по которому можно судить о наличии дисбиоза.

В случае доминирования условно-патогенных анаэробных микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом, можно сделать заключение, что дисбиоз вызван этой группой бактерий.

В случае значительных различий между значениями суммы определяемых бактерий и показателем ОКБ можно сделать вывод о присутствии в образце биоматериала микроорганизмов, не определяемых набором реагентов, а в случае сочетания таких различий со снижением нормобиоты, сделать вывод о наличии дисбиоза «неустановленной этиологии».

Принципы трактовки результатов изложены в Приложении Г.

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 термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 **Фасовка S**

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 **Фасовка A**

10.1.3.1. Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3.2. Допускается транспортирование полимеразы ТехноТаq MAX в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

10.1.4 **Фасовка A-TL**

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 **Фасовка S**

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2 **Фасовка A**

10.2.2.1. Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре

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

от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смеси для амплификации Стрим следует хранить в защищённом от света месте.

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

10.2.3 **Фасовка A-TL**

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смеси для амплификации Стрим следует хранить в защищённом от света месте.

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:

- все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX (фасовка А) следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- 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 TL-65 (фасовка A-TL) следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в закрытом фольгированном гриппере с влагопоглотителем в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТаq MAX (фасовка А) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

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

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 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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 применения 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 или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон	REF	Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
LOT	Код партии (серии)		Нестерильно
	Дата изготовления		

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

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

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

ГОСТ 2.105-2019 Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Общие требования к текстовым документам

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

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 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, 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 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»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Московская обл., г.о. Серпухов, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, 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

Медицинский директор
ООО «ДНК-Технология ТС»,
д.м.н. М.Н. Болдырева

«27.02» 2025 г.

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

Приложение А

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» при использовании набора реагентов ФЕМОФЛОР®АльфаСкрин в фасовке S

1) «Метод анализа» – «Геометрический (Ср)»;
2) Объём реакционной смеси – 35 мкл;
3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ 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	25[1]	…	…	Хранение		Хранение
√- режим оптических измерений						

4) Внести следующие параметры каналов детекции:

№ пробирки	Каналы детекции				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
1	*Lactobacillus* не-*iners*	*Lactobacillus iners*	-	ОКБ	*Gardnerella vaginalis*
2	*Bacteroides* spp./ *Porphyromonas* spp./ *Prevotella* spp.	ВК	-	*Mobiluncus* spp.	Маркер
3	*Anaerococcus* spp.	ВК	*Fannyhessea vaginae*	-	-
4	*Sneathia* spp./ *Leptotrichia* spp./ *Fusobacterium* spp.	ВК	-	-	-
5	*Megasphaera* spp./ *Veilonella spp./ Dialister* spp.	ВК	-	-	-
6	BVAB1 / BVAB2/ BVAB3	ВК	-	-	-
7	*Mycoplasma hominis*	*Ureaplasma urealyticum*	*Ureaplasma parvum*	ГДЧ	-
8	*Candida* spp.	ВК	*Candida albicans*	*Peptostreptococcus* spp.	-

[1] - допускается хранение при температуре 10 °С

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

Приложение Б

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующего амплификатора «ДТпрайм» при использовании набора реагентов ФЕМОФЛОР®АльфаСкрин в фасовке А, фасовке А-TL

1) «Метод анализа» – «Геометрический (Ср)»;

2) Объём реакционной смеси – 12 мкл;

3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25[1]	…	…	Хранение		Хранение
√- режим оптических измерений						

4) Внести следующие параметры каналов детекции:

№ пробирки	Каналы детекции				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
1	*Lactobacillus* не-*iners*	*Lactobacillus iners*	-	ОКБ	*Gardnerella vaginalis*
2	*Bacteroides* spp./ *Porphyromonas* spp./ *Prevotella* spp.	ВК	-	*Mobiluncus* spp.	Маркер
3	*Anaerococcus* spp.	ВК	*Fannyhessea vaginae*	-	-
4	*Sneathia* spp./ *Leptotrichia* spp./ *Fusobacterium* spp.	ВК	-	-	-
5	*Megasphaera* spp./ *Veilonella spp./ Dialister* spp.	ВК	-	-	-
6	BVAB1 / BVAB2/ BVAB3	ВК	-	-	-
7	*Mycoplasma hominis*	*Ureaplasma urealyticum*	*Ureaplasma parvum*	ГДЧ	-
8	*Candida* spp.	ВК	*Candida albicans*	*Peptostreptococcus* spp.	-

[1] - допускается хранение при температуре 10 °С

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

Приложение В

Сокращённая методика выделения ДНК из мазков/соскобов эпителия со слизистой оболочки влагалища, цервикального канала с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС

ВНИМАНИЕ

1. Перед началом работы необходимо:

   - включить термостат для прогревания до 65 °С;

   - достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка необходимо прогреть флакон с лизирующим раствором на термостате, предварительно прогретом до 65 °С, до полного растворения осадка. Затем следует перемешать раствор переворачиванием флакона вверх дном 5–10 раз, избегая пенообразования. Перед использованием охладите раствор до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С). Осадок также можно растворить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение приблизительно 12 часов.

2. При прогревании пробирок с образцами возможно открывание крышек! Следует использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.», производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

1. Промаркируйте одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл для отрицательного контрольного образца (К-).

2. Внесите в каждую промаркированную пробирку с подготовленным для исследования материалом в объёме 100 мкл (см.6.5) и в пробирку, промаркированную «К-», по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

3. Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца.

4. Плотно закройте пробирки, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

5. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.

6. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

7. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

8. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 10 мин.

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

9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
10. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закройте пробирки и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.
11. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
13. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закройте пробирки и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.
14. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
15. Не задевая осадок, удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объёмом не более 20-30 мкл.
16. Откройте пробирки и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
17. Добавьте к осадку 300 мкл буфера для растворения, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
18. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
19. Осадите конденсат центрифугированием при RCF(g) 12000 - 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 30 с.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР после хранения необходимо разморозить препарат ДНК и отрицательный контрольный образец при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, затем встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Для препарата ДНК допускается только однократное размораживание!

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

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

Приложение Г

Принципы трактовки результата

Трактовка результата включает анализ абсолютных количественных данных и абсолютных количественных данных, нормированных на общее количество бактерий с целью оценки доли тех или иных микроорганизмом/групп микроорганизмов в общем количестве бактерий, состоит из следующих этапов:

- количественное определение контрольных показателей для образца биоматериала, ДНК дрожжевых грибов *Candida*:

Показатель/Микроорганизм	Трактовка результата
ОКБ, ГДЧ, *Candida* spp, *Candida albicans*	Не обнаружено (ниже порога обнаружения) / ниже предела измерения / концентрация (Lg_{10} n)

- определение абсолютного и относительного (нормированного на общее количество бактерий) количества ДНК бактерий, относящихся к нормальной и условно-патогенной микробиоте:

Микроорганизм	Трактовка абсолютного результата, ГЭ/мл	Трактовка результата, нормированного на ОКБ (%)
НОРМОБИОТА		
Lactobacillus iners, Lactobacillus не-iners	Не обнаружено (ниже порога обнаружения) / ниже предела измерения /концентрация Lg_{10} n	≥80 нормальное количество 20<80 – умеренно сниженное количество <20 – значительно сниженное количество
Нормобиота, сумма		
УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ (УПМ)		
В случае снижения количества НОРМОБИОТЫ		
анаэробные УПМ, ассоциированные с бактериальным вагинозом		Сумма анаэробных УПМ ≥80 от ОКБ – снижение нормобиоты связано с увеличением УПМ, ассоциированными с бактериальным вагинозом Сумма генитальных УПМ-микоплазм ≥80 от ОКБ – снижение нормобиоты связано с увеличением генитальных УПМ-микоплазм
Gardnerella vaginalis, Fannyhessea vaginae, Mobiluncus spp., *Anaerococcus* spp./ *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp./ *Porphyromonas* spp./ *Prevotella* spp., *Sneathia* spp./ *Leptotrichia* spp./ *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./ *Veilonella* spp./ *Dialister* spp., BVAB1 /BVAB2/ BVAB3	Не обнаружено / ниже предела измерения /концентрация Lg_{10} n	
УПМ генитальные микоплазмы: *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum*	Не обнаружено / ниже предела измерения /концентрация Lg_{10} n	
Условно-патогенные микроорганизмы, сумма		

- если сумма абсолютного количества бактерий ниже, чем ОКБ, более чем на 0,5Lg, это свидетельствует о присутствии в образце бактерий, не определяемых набором, а в сочетании со снижением нормобиоты – о дисбиозе «неустановленной этиологии».

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