



1151-1 2025-06-02



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для количественной оценки состава микробиоты,
качественного и количественного определения ДНК
основных патогенных микроорганизмов в репродуктивном тракте женщин
методом ПЦР в режиме реального времени

ФЕМОФЛОР® II

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2025/24831 от 14 февраля 2025 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
2.1	Состав набора реагентов.....	5
2.2	Количество анализируемых образцов.....	6
2.3	Принцип метода	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
3.1	Аналитическая специфичность	9
3.2	Интерферирующие вещества	10
3.3	Предел обнаружения	11
3.4	Диапазон измерения, предел измерения.....	12
3.5	Метрологическая прослеживаемость	12
3.6	Диагностические характеристики.....	13
3.7	Точность измерений.....	14
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	15
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	17
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	20
6.1	Материал для исследования	20
6.2	Общие требования	20
6.3	Взятие материала на исследование	20
6.4	Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	21
6.5	Подготовка биологического материала для выделения ДНК	21
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	23
7.1	Выделение ДНК из биологического материала	23
7.2	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	23
7.3	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А, фасовка А-ТL с использованием дозирующего устройства ДТстрим	25
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	28
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	28
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	31
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	33
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	33
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	33
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	33
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	34
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	35
	Приложение А.....	36
	Приложение Б.....	38
	Приложение В.....	40
	Приложение Г.....	42

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
ДБА	- доля бактериального анализа
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для количественной оценки состава микробиоты, качественного и количественного определения ДНК основных патогенных микроорганизмов в репродуктивном тракте женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР®II), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для количественного определения ДНК представителей нормобиоты *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* / *Lactobacillus mulieris*, *Lactobacillus gasseri* / *Lactobacillus paragasseri*, *Bifidobacterium* spp., условно-патогенных микроорганизмов *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Candida* spp., *Candida albicans*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp., *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp., BVAB1/BVAB2/BVAB3, качественного и количественного определения ДНК патогенных микроорганизмов *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, HSV1, HSV2, CMV, HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31/33/35/39/51/52/56/58/59/66/68 в биологическом материале из репродуктивного тракта женщин (мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища) методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению анализа:

– острые и хронические формы инфекционно-воспалительных заболеваний 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 (например, врач клинической лабораторной диагностики, врач-лаборант, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник)).

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в стандартной фасовке (маркируется – фасовка S) и в фасовках для автоматизированного дозирования (маркируются – фасовка A, фасовка A-TL).

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P811-S3/6, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином Стрип №1	Прозрачная бесцветная, розовая или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином Стрип №2	Прозрачная бесцветная, розовая или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-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	320 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

REF R1-P811-XA/5, фасовка A			
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.		
Крышки для стрипов	2 шт.		

REF R1-P812-XA/5, 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.		
Крышки для стрипов	2 шт.		

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+»

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 12 определений (не более 4 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке А и в фасовке А-TL рассчитан на проведение 24 определений (одна постановка на 24 образца или две постановки по 12 образцов), 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 праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Для фасовки S «горячий» старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при начальном прогреве пробирки. «Горячий» старт для фасовки А и фасовки А-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 начальном прогреве пробирки.

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 ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

Набор реагентов включает смеси для амплификации, специфичные для выявления ДНК лактобацилл, патогенных и 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 пробирки №3 Стрипа №1 и пробирки №4 Стрипа №2) входит внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции в каждой отдельной пробирке.

Для контроля расположения стрипов в термоблоке детектирующего амплификатора в смеси для амплификации пробирки №2 Стрипа №1 и пробирки №3 Стрипа №2 добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «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 несоответствие (при неправильном расположении стрипа), то предупреждает оператора об этом несоответствии. В этом случае необходимо проверить расположение стрипов в термоблоке (первая пробирка Стрипа №1 и вторая пробирка Стрипа №2 отмечены голубым буфером) и скорректировать идентификаторы пробирок в протоколе.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов определяемых микроорганизмов, включены флуоресцентные метки: Fam, Rox, Hex, Cy5, Cy 5.5. В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, 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

№ про- бирки	Каналы детекции					Цветовая маркировка смеси для амплификации
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5	
Стрип №1						
1	ОКБ	БК	–	–	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Голубая
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	БК	Маркер	–	–	Бесцветная или розовая
3	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i> / <i>Lactobacillus mulieris</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> / <i>Lactobacillus paragasseri</i>	–	
4	<i>Staphylococcus</i> spp.	БК	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	
5	<i>Mobiluncus</i> spp.	БК	–	<i>Haemophilus</i> spp.	–	
6	<i>Anaerococcus</i> spp.	БК	<i>Fannyhessea vaginae</i>	–	–	
7	<i>Bacteroides</i> spp. / <i>Porphyromonas</i> spp. / <i>Prevotella</i> spp.	БК	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	–	
8	<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	БК	–	–	–	
Стрип №2						
1	<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp.	БК	–	–	–	Бесцветная или розовая
2	BVAB1/ BVAB2/ BVAB3	БК	–	–	–	Голубая
3	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	БК	Маркер	<i>Bifidobacterium</i> spp.	–	Бесцветная или розовая
4	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	ГДЧ	–	
5	<i>Candida</i> spp.	БК	<i>Candida albicans</i>	–	–	
6	<i>Trichomonas vaginalis</i>	БК	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
7	HSV2	БК	CMV	HSV1	–	
8	HPV 16	БК	HPV 31/33/35/39/ 51/52/56/58/59/ 66/68	HPV 18	HPV 45	

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]).

В расчёте учитывается значения порогового цикла (C_t) 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 (C_p) (Ребриков и др., 2014). Эффективность ПЦР – это число, показывающее, во сколько раз за один цикл амплификации изменится количество фрагментов ДНК.

Расчет проводится согласно формуле:

$$\text{Log}(NO_a) = \text{Log}(E) \times (C_p - C_{p_a}), \quad (1)$$

где NO_a – исходное количество копий ДНК-мишени в 1,0 мл препарата ДНК анализируемого образца;

E – эффективность ПЦР;

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

C_{p_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®II.

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 Нех (за исключением пробирок без ВК, см. таблицу 1).

Аналитическая специфичность набора ФЕМОФЛОР®II 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 микроорганизмов		
<i>Anaerococcus octavius</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Anaerococcus vaginalis</i>	HSV1	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	HSV2	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	HPV 16	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	HPV 18	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	HPV 31	<i>Peptoniphilus septimus</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	HPV 33	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	HPV 35	<i>Peptostreptococcus faecalis</i>
BVAB1	HPV 39	<i>Porphyromonas vaginalis</i>
BVAB2	HPV 45	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
BVAB3	HPV 51	<i>Prevotella copri</i>
<i>Candida albicans</i>	HPV 52	<i>Prevotella stercorea</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	HPV 56	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	HPV 58	<i>Propionibacterium avidum</i>
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	HPV 59	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Corynebacterium vaginale</i>	HPV 66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CMV	HPV 68	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
<i>Dialister invisus</i>	<i>Human herpesvirus 6</i>	<i>Sneathia vaginalis</i>
<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Human herpesvirus 8</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Eggerthella hominis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Streptococcus pneumonia</i>
<i>Enterobacter intestinhominis</i>	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus mulieris</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Epstein-Barr virus	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Fannyhessea vaginae</i>	<i>Leptotrichia massiliensis</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	<i>Veillonella dispar</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Mobiluncus curtisii</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>	

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (недостовверных) 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®II. 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.

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
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1,0×10 ²
<i>Candida</i> spp., <i>Candida albicans</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>	5,0×10 ²
ОКБ, ГДЧ, <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus iners</i> , <i>Lactobacillus jensenii / mulieris</i> , <i>Lactobacillus gasseri / paragasseri</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Mobiluncus</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp., <i>Anaerococcus</i> spp., <i>Fannyhessea vaginae</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Sneathia</i> spp., <i>Leptotrichia</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Megasphaera</i> spp., <i>Veillonella</i> spp., <i>Dialister</i> spp., BVAB1, BVAB2, BVAB3, <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , HSV1, HSV2, CMV	1,0×10 ³
HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31/33/35/39/51/52/ 56/58/59/66/68	5,0×10 ³

3.4 Диапазон измерения, предел измерения

Диапазон измерения количественно определяемых аналитов, определяемых набором реагентов, находится в пределах от $1,0 \times 10^4$ до $1,0 \times 10^9$ 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 $1,0 \times 10^4$ 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 ISO 17511-2011). 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 $1,0 \times 10^4$ – $1,0 \times 10^6$ коп/мл. Согласно ГОСТ ISO 17511-2011 положительный контрольный образец является контрольным материалом правильности.

Неопределённость измерения составляет 0,4.

3.6 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95% указаны в таблице.

Биологический материал	ДНК	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
		Положительные	Отрицательные		
Мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища	<i>Chlamydia trachomatis</i>	100	300	100% (97,2 – 100)	100% (99,1 – 100)
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100	300	100% (97,2 – 100)	100% (99,1 – 100)
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	100	300	100% (97,2 – 100)	100% (99,1 – 100)
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	100	300	100% (97,2 – 100)	100% (99,1 – 100)
	HSV1	100	200	100% (97,2 – 100)	100% (98,6 – 100)
	HSV2	100	200	100% (97,2 – 100)	100% (98,6 – 100)
	CMV	100	200	100% (97,2 – 100)	100% (98,6 – 100)
	HPV 16	100	200	100% (97,2 – 100)	100% (98,6 – 100)
	HPV 18	100	200	100% (97,2 – 100)	100% (98,6 – 100)
	HPV 45	100	200	100% (97,2 – 100)	100% (98,6 – 100)
	HPV 31/33/35/39/51/52/56/58/59/66/68	100	200	100% (97,2 – 100)	100% (98,6 – 100)

Примечание – Диагностическая чувствительность и специфичность была установлена в ходе проведения клинических исследований в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008.

Диагностические характеристики набора для количественного определения ДНК бактерий, человека, представителей нормобиоты *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii / mulieris*, *Lactobacillus gasseri / paragasseri*, *Bifidobacterium* spp., количественного определения ДНК условно-патогенных микроорганизмов *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Candida* spp., *Candida albicans*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp., *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp., BVAB1/BVAB2/BVAB3 не определяются в связи с тем, что перечисленные анализы могут присутствовать у здоровых женщин в репродуктивном тракте, поэтому набор определяет их только в количественном формате. Для количественных методик согласно ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 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.

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 клинично-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.

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 ТехноTaq 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.

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.

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 ПЦР	нет	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
транспортная среда, рекомендуются ³ : <ul style="list-style-type: none"> – Транспортная среда для биопроб STOP-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640; – Транспортная среда для биопроб с муколитиком (STOP-M)⁴ по ТУ 21.20.23-102-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2019/9453. Валидированы следующие среды для жидкостной цитологии: <ul style="list-style-type: none"> – 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 Bidyne, Ю.Корея, РУ № ФСЗ 2010/07117; – EASYPREP, YD Diagnostics, Ю.Корея, РУ № РЗН 2021/14717; – Cell Preservative Solution, Human Litu Biotechnology Co.Ltd, Китай, РУ № РЗН 2022/17203. 		

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S	Фасовка A, Фасовка A-TL
<p>– 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:</p> <p>– Устройство для самостоятельного взятия пробы для лабораторной диагностики в гинекологии Qvintip (Квинтип), «Arrovix АВ», Швеция, РУ №РЗН 2019/8249;</p> <p>– Устройство медицинское – Сваб-система Соран, "Копан Италия С.п.А.", Италия, РУ № ФСЗ 2010/07660.</p>		
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)		
<p>набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала, рекомендуются:</p> <p>– 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;</p> <p>– 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;</p> <p>– 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;</p> <p>– 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;</p> <p>– 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.</p>		
<p>Примечания к таблице:</p> <p>¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже</p> <p>² – валидирован детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм» 5Х*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229</p> <p>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</p> <p>⁴ – не рекомендуется для совместного применения с набором реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД II</p>		

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 A, фасовка A-TL);
- 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.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

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

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.

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 метода¹: 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.

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.

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектам реагентов для выделения НК

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 объемом 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 объеме, 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.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК из мазков/соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища 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 два стрипа (Стрип №1 и Стрип №2) со смесями для амплификации, запечатанными парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Два стрипа рассчитаны на исследование одного образца.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 Стрипа №1 и 4 Стрипа №2 для неизвестных образцов; один Стрип №1, один Стрип №2 для «К-» и один Стрип №1, один Стрип №2 для «К+». Общее количество стрипов – 12.

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

- 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.
- 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 тест¹. 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 4.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка S)

№ блока	Температура, °C	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

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А, фасовка А-ТЛ 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 ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с. Для проведения 24 определений одновременно используются две пробирки с ПЦР-буфером Стрим и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для проведения 12 определений используются одна пробирка с ПЦР-буфером Стрим и одна пробирка с полимеразой ТехноТaq МАХ.

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 °C

Фасовка А-ТЛ. Встряхните пробирки с буфером ТЛ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с. Центрифугируйте пробирки с буфером ТЛ и полимеразой ТЛ-65 на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с. Для проведения 24 определений одновременно используются две пробирки с буфером ТЛ и две пробирки с полимеразой ТЛ-65. Для проведения 12 определений используются одна пробирка с буфером ТЛ и одна пробирка с полимеразой ТЛ-65.

ВНИМАНИЕ!

1. Полимеразу ТехноТaq МАХ 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 ТехноТaq МАХ и анализируемые образцы ДНК согласно руководству по эксплуатации ДТстрим.

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

7.3.3 При использовании интегрального способа постановки:

Фасовка А. Предварительной подготовки раствора полимеразы ТехноТaq МАХ и анализируемых образцов не требуется.

Фасовка А-ТЛ. Предварительной подготовки раствора полимеразы ТЛ-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 №1 и вторая пробирка Стрипа №2 отмечены голубым буфером), пробирки с подготовленным раствором полимеразы ТехноТaq МАХ или полимеразы ТЛ-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 №1 и вторая пробирка Стрипа №2 отмечены голубым буфером), пробирки с ПЦР-буфером Стрим, полимеразой ТехноТaq МАХ, буфером для разведения НК, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим.

Фасовка А-ТЛ. Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, ориентируясь на цветовую маркировку смеси (первая пробирка Стрипа №1 и вторая пробирка Стрипа №2 отмечены голубым буфером), пробирки с буфером ТЛ, полимеразой ТЛ-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 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 тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и

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

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 5.

Таблица 5 – 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

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 №1 и пробирка №2 Стрипа №2 отмечены голубым буфером) и скорректировать идентификаторы пробирок в протоколе.

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

9.3 При анализе результатов необходимо учитывать значения контрольных показателей (ОКБ, пробирка №1 Стрипа №1, канал Fat; ГДЧ, пробирка №4 Стрипа №2, канал детекции Су5) и внутреннего контроля (ВК, пробирки №№ 1–2, 4–8 Стрипа №1 и пробирки №№ 1–3, 5–8 Стрипа №2, канал детекции Нех):

9.3.1 Для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции используется ВК (отсутствует в пробирке №3 Стрипа №1 и пробирке №4 Стрипа №2). При отрицательных результатах, полученных в одной пробирке одновременно для ВК по каналу детекции Нех 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, для патогенных микроорганизмов результат учитывается независимо от значений ОКБ и ГДЧ (9.7).

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 превышает порог измерения, результат будет представлен в виде Lg ГЭ/мл образца. Для ДНК патогенных микроорганизмов, выявленных в количестве ниже порога измерения, будет указан положительный результат («+») для соответствующего аналита. Результат, полученный для ВК, в этом случае не учитывается.

9.5 В образцах исследуемого биоматериала, содержащих ДНК выявляемых аналитов, за исключением патогенных микроорганизмов, 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 Нех.

Результаты ниже порога обнаружения для всех аналитов, **за исключением** *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, HSV1, HSV2, CMV, HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31/33/35/39/51/52/56/58/59/66/68 считаются отрицательными.

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 ($5,0 \pm 1,0$ 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;
- для патогенных микроорганизмов результат учитывается независимо от значений ОКБ и ГДЧ. Он может быть отрицательным или положительным в двух вариантах – «Обнаружено» («+») 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 дрожжевых грибов *Candida spp.*, условно-патогенных генитальных микоплазм *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* 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 состава микробиоты проводится нормирование, то есть определение доли бактериального аналита (ДБА) в образце исследуемого биоматериала относительно общего количества бактерий (ОКБ) по формуле:

$$\text{ДБА} = \left[10 \right]^{Lg(\text{аналит})} / \left[10 \right]^{Lg(\text{ОКБ})} \times 100\%,$$

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

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

В результате можно оценить состав микробиоты, сделать вывод о доминировании нормальной или условно-патогенной микробиоты, а также выделить среди условно-патогенной микробиоты доминирующий микроорганизм/группу микроорганизмов или сделать заключение о смешанном бактериальном составе микробиоты.

Принципы трактовки результата изложены в Приложении Г.

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 А

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

10.1.4 Фасовка А-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 А

10.2.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, 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.

10.2.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ 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 А-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 ТехноТaq МАХ (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 А-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 ТехноТaq МАХ (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.

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

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Номер по каталогу
	Температурный диапазон		Изготовитель
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Не допускать воздействия солнечного света
	Использовать до		Нестерильно
	Код партии (серии)		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Дата изготовления		

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

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

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 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.

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, Россия, Московская область, 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

Приложение А

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

- 1) «Метод анализа» – «Геометрический (Ср)»;
- 2) Объем 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

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

4) Внести следующие параметры каналов детекции:

№ пробирики	Канал детекции, выявляемый показатель				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
1	ОКБ	БК	-	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	БК	Маркер	-	-
3	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i> / <i>Lactobacillus mulieris</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> / <i>Lactobacillus paragasseri</i>	-
4	<i>Staphylococcus</i> spp.	БК	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
5	<i>Mobiluncus</i> spp.	БК	-	<i>Haemophilus</i> spp.	-
6	<i>Anaerococcus</i> spp.	БК	<i>Fannyhessea vaginae</i>	-	-
7	<i>Bacteroides</i> spp. / <i>Porphyromonas</i> spp. / <i>Prevotella</i> spp.	БК	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	-
8	<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	БК	-	-	-
1	<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp.	БК	-	-	-
2	BVAB1/BVAB2/BVAB3	БК	-	-	-
3	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	БК	Маркер	<i>Bifidobacterium</i> spp.	-
4	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	ГДЧ	-
5	<i>Candida</i> spp.	БК	<i>Candida albicans</i>	-	-
6	<i>Trichomonas vaginalis</i>	БК	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
7	HSV2	БК	CMV	HSV1	-
8	HPV 16	БК	HPV 31/33/35/39/51/52/56/58/59/66/68	HPV 18	HPV 45

Приложение Б

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

- 1) «Метод анализа» – «Геометрический (Ср)»;
- 2) Объем 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

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

4) Внести следующие параметры каналов детекции:

№ пробирки	Канал детекции, выявляемый показатель				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
1	ОКБ	БК	-	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	БК	Маркер	-	-
3	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i> / <i>Lactobacillus mulieris</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> / <i>Lactobacillus paragasseri</i>	-
4	<i>Staphylococcus</i> spp.	БК	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
5	<i>Mobiluncus</i> spp.	БК	-	<i>Haemophilus</i> spp.	-
6	<i>Anaerococcus</i> spp.	БК	<i>Fannyhessea vaginae</i>	-	-
7	<i>Bacteroides</i> spp. / <i>Porphyromonas</i> spp. / <i>Prevotella</i> spp.	БК	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	-
8	<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	БК	-	-	-
1	<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp.	БК	-	-	-
2	BVAB1/BVAB2/BVAB3	БК	-	-	-
3	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	БК	Маркер	<i>Bifidobacterium</i> spp.	-
4	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	ГДЧ	-
5	<i>Candida</i> spp.	БК	<i>Candida albicans</i>	-	-
6	<i>Trichomonas vaginalis</i>	БК	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
7	HSV2	БК	CMV	HSV1	-
8	HPV 16	БК	HPV 31/33/35/39/51/52/56/58/59/66/68	HPV 18	HPV 45

Приложение В

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

ВНИМАНИЕ!

1. Перед началом работы необходимо:
 - включить термостат для прогрева 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 прогревом 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.
 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.

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 микроорганизмов/групп микроорганизмов в общем количестве бактерий, состоит из следующих этапов:

- качественно-количественное определение ДНК патогенных микроорганизмов:

Показатель/Микроорганизм	Трактовка результата
<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , HSV1, HSV2, CMV, HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31/33/35/39/51/52/ 56/58/59/66/68	Не обнаружено (ниже порога обнаружения) / ОБНАРУЖЕНО (выше порога обнаружения, но ниже порога измерения) / концентрация (Lg ₁₀ n)

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

Показатель/Микроорганизм	Трактовка результата
ОКБ, ГДЧ, <i>Candida spp</i> , <i>Candida albicans</i>	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		
<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.	Не обнаружено (ниже порога обнаружения) / ниже предела измерения / концентрация Lg ₁₀ п	≥80 нормальное количество 20<80 – умеренно сниженное количество <20 – значительно сниженное количество
Нормобиота, сумма		
УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ (УПМ)		
В случае снижения количества НОРМОБИОТЫ		
факультативно анаэробные УПМ, ассоциированные с аэробным вагинитом, сумма		Сумма факультативно анаэробных УПМ ≥80 от суммы УПМ – снижение нормобиоты связано с увеличением УПМ, ассоциированными с аэробным вагинитом Сумма анаэробных УПМ ≥80 от суммы УПМ – снижение нормобиоты связано с увеличением УПМ, ассоциированными с бактериальным вагинозом Сумма генитальных УПМ-микоплазм ≥80 от суммы УПМ – снижение нормобиоты связано с увеличением генитальных УПМ-микоплазм Сумма факультативно-анаэробных УПМ и анаэробных УПМ < 80% от суммы УПМ – снижение нормобиоты связано с увеличением смешанной УПМ
<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Haemophilus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	Не обнаружено (ниже порога обнаружения) / ниже предела измерения / концентрация Lg ₁₀ п	
анаэробные УПМ, ассоциированные с бактериальным вагинозом		
<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mobiluncus</i> spp., <i>Anaerococcus</i> spp., <i>Fannyhessea vaginae</i> , <i>Bacteroides</i> spp. / <i>Porphyromonas</i> spp. / <i>Prevotella</i> spp, <i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp, BVAB1/BVAB2/BVAB3, <i>Peptostreptococcus</i> spp	Не обнаружено / ниже предела измерения / концентрация Lg ₁₀ п	
УПМ генитальные микоплазмы:		
<i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i>	Не обнаружено / ниже предела измерения / концентрация Lg ₁₀ п	
Условно-патогенные микроорганизмы, сумма		

– определение присутствия в образце бактерий, не определяемых набором, в случае, когда сумма абсолютного количества бактерий ниже, чем ОКБ более чем на 0,5Lg.

ДНК-Технология

117587, Россия, г. Москва,

вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,

ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

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