ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

119-16 2024-10-01

IVD

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин
методом ПЦР в режиме реального времени

# ФЕМОФЛОР®

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2009/04663 от 02 августа 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ..... 3
1 НАЗНАЧЕНИЕ ..... 4
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА ..... 4
2.1 Состав набора реагентов ..... 4
2.2 Число анализируемых проб ..... 5
2.3 Принцип метода ..... 5
2.4 Время проведения анализа ..... 8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ..... 9
3.1 Специфичность ..... 9
3.2 Аналитическая чувствительность ..... 9
3.3 Контроль взятия материала ..... 9
3.4 Диагностическая чувствительность ..... 9
3.5 Диагностическая специфичность ..... 9
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ..... 9
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ ..... 11
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ ..... 12
6.1 Взятие образцов соскобов эпителиальных клеток ..... 12
6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала ..... 13
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ..... 14
7.1 Выделение ДНК из биологического материала ..... 14
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S ..... 14
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А ..... 16
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ..... 18
9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ ..... 19
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ ..... 20
10.1 Транспортирование ..... 20
10.2 Хранение ..... 20
10.3 Указания по эксплуатации ..... 20
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ ..... 21
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ ..... 21
Приложение А ..... 22
Приложение Б ..... 23

## ВВЕДЕНИЕ

Состояние вагинального микробиоценоза оказывает серьезное влияние на поддержание репродуктивной функции и, как следствие, на качество жизни женщины.

Заболевания, вызываемые условно-патогенной микрофлорой, могут протекать как с клиническими проявлениями, так и бессимптомно. Бессимптомное течение заболевания часто приводит к позднему обращению больных к врачу и развитию в следствии этого серьёзных осложнений. Заболевания, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, увеличивают риск заражения инфекциями, передаваемыми половым путём, и ВИЧ-инфекции. Своевременно не диагностированные инфекции, ассоциированные с условно-патогенной микрофлорой, могут стать причиной нарушения репродуктивной функции женщин, спонтанных абортов, преждевременных родов, внутриутробного инфицирования и низкой массы тела плода, постнатальных осложнений, а также осложнений после хирургического вмешательства на органах малого таза.

Актуальность проблем диагностики условно-патогенных микроорганизмов урогенитального тракта в настоящее время не подвергается сомнению. Методы диагностики, массово применяемые в рутинной лабораторной практике, не всегда дают возможность врачу адекватно оценить состояние пациентки и назначить необходимое лечение. В то же время, возможности современной ПЦР-лаборатории позволяют проводить многофакторные количественные исследования, выявляя ДНК различных микроорганизмов в полученных образцах.

Микробиоценоз урогенитального тракта женщины является частью сложной системы организма и зависит от множества внутренних и внешних факторов, таких как: гормональный статус, фаза цикла, иммунный статус, способ контрацепции, сексуальная активность, смена полового партнёра, приём лекарственных препаратов, наличие инфекционного процесса.

Набор реагентов ФЕМОФЛОР® позволяет из одной биопробы методом ПЦР в режиме реального времени выполнить количественную оценку общей бактериальной массы, урогенитальной нормофлоры – лактобактерий, типичных для урогенитального тракта женщин и комплекса аэробных и анаэробных микроорганизмов, микоплазм, грибов рода Candida, участвующих в развитии дисбиотических процессов урогенитальном микробиоценозе.

# 1 НАЗНАЧЕНИЕ

**1.1** Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов для исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР®).

**1.2** Набор реагентов ФЕМОФЛОР® предназначен для выявления ДНК лактобактерий, условно-патогенных микроорганизмов и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала) с целью исследования состояния биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

**1.3** Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

# 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

**2.1** Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в трёх вариантах комплектации, в зависимости от перечня выявляемых показателей: Фемофлор® 16, Фемофлор® 8 и Фемофлор® 4.

Комплектация Фемофлор® 16 выпускается в следующих фасовках: стандартная (маркируется – фасовка S), для автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка A).

Комплектации Фемофлор® 8 и Фемофлор® 4 выпускаются только стандартной фасовки.

Набор реагентов стандартной фасовки (фасовка S) включает следующие компоненты:

<table>
<tr><th colspan="6">Стандартная (фасовка S)</th></tr>
<tr><td>Вариант комплектации</td><td>Фемофлор® 16</td><td>Фемофлор® 8</td><td>Фемофлор® 4</td><td colspan="2" rowspan="2">Номинальное количество компонента</td></tr>
<tr><td>Количество определений, шт.</td><td>12</td><td>24</td><td>48</td></tr>
<tr><td>Наименование компонентов</td><td colspan="3">Количество пробирок</td><td colspan="2">Номинальное количество компонента</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Смеси для амплификации, запечатанные парафином</td><td>Стрип № 1<br>12 стрипов<br>по 8 пробирок</td><td colspan="2" rowspan="2">24 стрипа по 8 пробирок</td><td colspan="2" rowspan="2">по 20 мкл</td></tr>
<tr><td>Стрип № 2<br>12 стрипов<br>по 8 пробирок</td></tr>
<tr><td>Раствор Taq-полимеразы</td><td colspan="3">4 пробирки</td><td colspan="2">по 500 мкл</td></tr>
<tr><td>Минеральное масло</td><td colspan="3">4 пробирки</td><td colspan="2">по 1,0 мл</td></tr>
<tr><td>Положительный контрольный образец</td><td colspan="3">1 пробирка</td><td colspan="2">160 мкл</td></tr>
<tr><td>Принадлежности:<br>Крышки для стрипов</td><td colspan="3">24 шт.</td><td colspan="2">–</td></tr>
</table>

Набор фасовки для автоматизированного дозирования (фасовка А) включает следующие компоненты:

| Для автоматизированного дозирования (фасовка А) | | |
|---|---|---|
| Вариант комплектации | Фемофлор® 16 | |
| Количество определений, шт. | 24 | |
| Наименование компонентов | Количество пробирок | Номинальное количество компонента |
| Смеси для амплификации Стрим | двойной стрип 16 пробирок | по 140 мкл |
| ПЦР-буфер Стрим-К | 2 пробирки | по 600 мкл |
| Полимераза ТехноТаq МАХ | 2 пробирки | по 60 мкл |
| Буфер для разведения ДНК | 4 пробирки | по 1,0 мл |
| Положительный контрольный образец | 2 пробирки | по 100 мкл |
| Принадлежности:<br>Стрипы по 8 пробирок<br>Крышки для стрипов | <br>10 шт.<br>2 шт. | <br>–<br>– |
| Примечание – Приведена фасовка для использования дозирующего устройства ДТстрим для дальнейшего проведения ПЦР на детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» (384 лунки) | | |

**2.2** Число анализируемых проб

Фемофлор® 16 предназначен для проведения 12 определений (фасовка S) и 24 определений (фасовка А), включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор реагентов выявляет 25 показателей, включая 23 группы микроорганизмов, контроль взятия материала и общую бактериальную массу.

Фемофлор® 8 предназначен для проведения 24 определений, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор реагентов выявляет 11 показателей, включая 9 группы микроорганизмов, контроль взятия материала и общую бактериальную массу.

Фемофлор® 4 предназначен для проведения 48 определений, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор реагентов выявляет 7 показателей, включая 5 групп микроорганизмов контроль взятия материала и общую бактериальную массу.

**2.3** Принцип метода

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для стандартной фасовки набора реагентов методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина, для автоматизированной фасовки – модификацией полимеразы ТехноТаq МАХ. Используемый подход исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В смеси для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации, включены флуоресцентные метки Fam, Hex, Rox (см. таблицы 1–3). Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты нескольких разных реакций амплификации, одновременно проходящих в одной пробирке.

Для контроля расположения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора в некоторые смеси для амплификации добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox. Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в термоблоке. После прохождения амплификации программа сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом, Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца.

В наборе реагентов ФЕМОФЛОР® в одну из пробирок со смесью для амплификации добавлен внутренний контроль (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

Набор реагентов ФЕМОФЛОР® включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бактериальная масса), смесь, специфичную для лактобактерий (Lactobacillus spp.) и смеси, специфичные для выявляемых микроорганизмов (разные составы в зависимости от комплектации Фемофлор®16, Фемофлор®8, Фемофлор®4). Комплектации приведены в таблице 1, 2, 3.

Одна из смесей предназначена для амплификации геномной ДНК человека (контроль взятия клинического материала, КВМ). КВМ используется для исключения ошибок преаналитического этапа. В случае недостаточного для анализа количества взятого материала требуется повторное получение клинического материала.

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

Для проведения ПЦР используют детектирующие амплификаторы «ДТпрайм[1]», «ДТлайт[2]» и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология).

[1] – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6
[2] – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

После прохождения амплификации по показателю индикаторного цикла программно рассчитывается количество общей бактериальной массы, лактобактерий и каждого из условно-патогенных микроорганизмов.

Варианты комплектации набора реагентов ФЕМОФЛОР®, выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

Таблица 1 – Фемофлор®16

| Номер пробирки в стрипе | Канал детекции | | | Цвет буфера | Цвет парафина[2] |
|---|---|---|---|---|---|
| | Fam | Hex | Rox | | |
| **Стрип № 1** | | | | | |
| 1 | Общая бактериальная масса (ОБМ) | – | – | Голубой | Белый |
| 2 | Нормофлора – Lactobacillus spp.[1] | ВК | – | Бесцветный | |
| 3 | Enterobacterium spp. | – | – | | |
| 4 | Streptococcus spp. | – | – | | |
| 5 | Staphylococcus spp. | – | Маркер | | |
| 6 | Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp. | – | – | | |
| 7 | Eubacterium spp. | – | – | | |
| 8 | Sneathia spp. / Leptotrichia spp. / Fusobacterium spp. | – | – | | |
| **Стрип № 2** | | | | | |
| 1 | Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister spp. | – | – | Голубой | Голубой |
| 2 | Lachnobacterium spp. / Clostridium spp. | – | – | Бесцветный | |
| 3 | Mobiluncus spp. / Corynebacterium spp. | – | – | | |
| 4 | Peptostreptococcus spp. | – | – | | |
| 5 | Atopobium vaginae | – | – | | |
| 6 | Mycoplasma hominis | Mycoplasma genitalium | – | | |
| 7 | Ureaplasma (urealyticum + parvum) | – | – | | |
| 8 | Candida spp. | КВМ | Маркер | | |

[1] – под spp. подразумевается широкая группа микроорганизмов, относящаяся к данному роду, но может не соответствовать полностью роду в его систематическом понимании

[2] – парафин присутствует в стрипах со смесями для амплификации только для наборов стандартной фасовки

Таблица 2 – Фемофлор®8

| Номер пробирки в стрипе | Канал детекции | | | Цвет буфера | Цвет парафина[2] |
|---|---|---|---|---|---|
| | Fam | Hex | Rox | | |
| 1 | Общая бактериальная масса (ОБМ) | – | – | Голубой | Белый |
| 2 | Нормофлора – Lactobacillus spp.[1] | ВК | – | Бесцветный | |
| 3 | Enterobacterium spp. | – | – | | |
| 4 | Streptococcus spp. | – | – | | |
| 5 | Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp. | – | – | | |
| 6 | Eubacterium spp. | – | – | | |
| 7 | Mycoplasma hominis | Mycoplasma genitalium | – | | |
| 8 | Candida spp. | КВМ | Маркер | | |

[1] – под spp. подразумевается широкая группа микроорганизмов, относящаяся к данному роду, но может не соответствовать полностью роду в его систематическом понимании
[2] – парафин присутствует в стрипах со смесями для амплификации только для наборов стандартной фасовки

Таблица 3 – Фемофлор®4

| Номер пробирки в стрипе | Канал детекции | | | Цвет буфера | Цвет парафина[2] |
|---|---|---|---|---|---|
| | Fam | Hex | Rox | | |
| 1,5 | Общая бактериальная масса (ОБМ) | – | – | Голубой | Белый |
| 2,6 | Нормофлора – Lactobacillus spp.[1] | ВК | – | Бесцветный | |
| 3,7 | Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp. | – | – | | |
| 4,8 | Candida spp. | КВМ | Маркер | | |

[1] – под spp. подразумевается широкая группа микроорганизмов, относящаяся к данному роду, но может не соответствовать полностью роду в его систематическом понимании
[2] – парафин присутствует в стрипах со смесями для амплификации только для наборов стандартной фасовки

**2.4** Время проведения анализа – от 2,5 ч, включая этап пробоподготовки.

## 3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

При исследовании биоценоза урогенитального тракта у женщин определяется количество микроорганизмов в транспортной среде, пропорциональное общей обсемененности соответствующего биотопа.

**3.1** Специфичность

Список выявляемых набором показателей представлен в таблицах 1, 2, 3.

В образцах биологического материала, содержащих ДНК выявляемого показателя, во время проведения амплификации детектирующий амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемого показателя, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке отсутствует.

**3.2** Аналитическая чувствительность

Не более 10000 копий/мл.

**3.3** Контроль взятия материала

В образцах биологического материала, в котором присутствует геномная ДНК человека детектирующий амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке.

В образцах биологического материала, в котором отсутствует геномная ДНК человека, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке отсутствует.

**3.4** Диагностическая чувствительность: 97%.

**3.5** Диагностическая специфичность: 97%.

## 4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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

Подготовку и проведение к ПЦР следует проводить в ПЦР-боксах.

Лабораторное оборудование и принадлежности, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

При работе с набором реагентов «в режиме реального времени» при удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) запрещается открытие пробирок, так как это может привести к разбрызгиванию содержимого и контаминации продуктами ПЦР оборудования, реагентов и лабораторной зоны.

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

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Не использовать набор реагентов:

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

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, 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 ФЕМОФЛОР® необходимы оборудование и материалы, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Материалы, оборудование и реагенты

| Оборудование и материалы | Вариант фасовки | |
|---|---|---|
| | S | A |
| ПЦР-бокс | да | да |
| Амплификатор детектирующий «ДТпрайм[1]» | да | да |
| Амплификатор детектирующий «ДТлайт[2]», ДТ-96 | да | нет |
| Устройство дозирующее ДТстрим | нет | да |
| Устройство герметизирующее ДТпак | нет | да |
| Холодильник бытовой с морозильной камерой | да | да |
| Центрифуга с ускорением RCF(g) 13000 | да | да |
| Микроцентрифуга-вортекс | да | да |
| Центрифуга для микропланшет ПЦР (384 лунки) | нет | да |
| Термостат твердотельный, поддерживающий температуру до 65 °С | да | да |
| Дозаторы электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объема одноканальные и сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5–10 мкл, 2,0–20 мкл, 10–100 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 200–1000 мкл | да | да |
| Одноразовые наконечники с фильтром вместимостью 1,0–20 мкл, 1,0–200 мкл, 100–1000 мкл | да | да |
| Микропланшет ПЦР (384 лунки) | нет | да |
| Полимерная термопленка для запаивания микропланшета | нет | да |
| Пробирки объёмом 1,5 мл | да | да |
| Перчатки одноразовые без талька | да | да |
| Штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл | да | да |
| Физиологический раствор (0,9 % NaCl) стерильный или транспортная среда для биопроб | да | да |
| Ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов | да | да |
| Комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ) | да | да |

[1] – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6
[2] – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

# 6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют соскобы эпителиальных клеток из влагалища (заднебоковые своды), уретры, цервикального канала. Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС и ПРОБА-МЧ.

## 6.1 Взятие образцов соскобов эпителиальных клеток

Взятие соскобов эпителиальных клеток проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с 300 мкл стерильного физиологического раствора или в пробирки с транспортной средой.

### 6.1.1 Общие требования

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Исследование микрофлоры урогенитального тракта методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, то есть образец биоматериала анализируется на наличие и количество ДНК нормо- и условно-патогенной микрофлоры. Одновременно анализируется качество взятия биоматериала при помощи количественной оценки геномной ДНК человека.

### 6.1.2 Материал для исследований

Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию (влагалище, уретра, цервикальный канал) для оценки состояния урогенитальной микрофлоры принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

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. Неправильное взятие биоматериала может привести к невозможности получения достоверного результата и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.

### 6.1.3 Особенности взятия материала из влагалища

Материал должен быть взят ДО проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить тёплым стерильным физиологическим раствором, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано. Соскоб берут с бокового или заднего нижнего свода влагалища.

У девочек взятие материала производят со слизистой оболочки преддверия влагалища, а в отдельных случаях – из заднего свода влагалища через гименальные кольца.

6.1.4 Особенности взятия материала из уретры:

- перед взятием биоматериала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5–2 часов;
- непосредственно перед взятием биоматериала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном (который можно смочить стерильным физиологическим раствором);
- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15–20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия биоматериала;
- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1–1,5 см, у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

6.1.5 Особенности взятия материала из цервикального канала:

- перед взятием материала необходимо удалить стерильным ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5–1,5 см;
- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание стенок влагалища.

6.1.6 Порядок взятия материала в пробирку с транспортной средой

- Открыть крышку пробирки.
- С помощью одноразового зонда сделать соскоб эпителиальных клеток из соответствующего биотопа (влагалище, уретра, цервикальный канал).
- Перенести зонд с биоматериалом в пробирку с транспортной средой и тщательно прополощите его, избегая разбрызгивания жидкости.
- Извлечь зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удалить избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизировать.
- При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторить процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.
- Плотно закрыть крышку пробирки, промаркировать пробирку.

**6.2** Транспортирование и хранение исследуемого материала

**ВНИМАНИЕ!** Время от взятия материала до начала исследования не должно превышать 24 часов.

Транспортировать и хранить образцы до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С.

В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала.

# 7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

## 7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК (пробоподготовку) проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ.

Примечание – При использовании для взятия биологического материала пробирок с реактивом ПРОБА-РАПИД выделение ДНК необходимо проводить только с использованием комплекта ПРОБА-НК-ПЛЮС.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с набором реагентов ФЕМОФЛОР® можно узнать у представителя компании.

**ВНИМАНИЕ!** Комплект для выделения ДНК из биологического материала не входит в состав набора ФЕМОФЛОР®.

**ВНИМАНИЕ!** Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать стерильный физиологический раствор или транспортную среду для биопроб в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

## 7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

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

**ВНИМАНИЕ!** Следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте стрипы со смесями для амплификации, запечатанные парафином для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (К+) и отрицательного контрольного образца (К–).

Примечание – Для Фемофлор®16 два стрипа рассчитаны на исследование одного образца, для Фемофлор®8 один стрип рассчитан на исследование одного образца, для Фемофлор®4 один стрип рассчитан на исследование двух образцов.

Например, необходимо проанализировать два образца.

Для Фемофлор®16 нужно промаркировать 8 стрипов – 4 для исследуемых образцов, два стрипа – «К+» и два стрипа – «К–».

Для Фемофлор®8 нужно промаркировать 4 стрипа – два для исследуемых образцов, один стрип – «К+» и один стрип – «К–».

Для Фемофлор®4 нужно промаркировать два стрипа – один для исследуемых образцов и один «К+» и «К–» (см. таблицу 5).

Таблица 5 – Маркировка пробирок для проведения ПЦР

| | Фемофлор®16 | Фемофлор®8 | Фемофлор®4 |
|---|---|---|---|
| Образец 1 | Пробирки 1–8<br>Стрип № 1 и Стрип № 2 | Пробирки 1–8 | Пробирки 1–4 |
| Образец 2 | Пробирки 1–8<br>Стрип № 1 и Стрип № 2 | Пробирки 1–8 | Пробирки 5–8 |
| К+ | Пробирки 1–8<br>Стрип № 1 и Стрип № 2 | Пробирки 1–8 | Пробирки 5–8 |
| К– | Пробирки 1–8<br>Стрип № 1 и Стрип № 2 | Пробирки 1–8 | Пробирки 1–4 |

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

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

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

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

**ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в каждую пробирку стрипов для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК, закройте стрип крышкой. В стрипы, маркированные «К+» и «К–», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца из набора реагентов, закройте стрип крышкой.

7.2.8 Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К–», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего все этапы выделения ДНК, закройте стрип крышкой.

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

7.2.10 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР добавьте файл с параметрами теста[1]. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, 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.

[1] – инструкции по добавлению «готовых файлов с параметрами теста» находятся на сайте в разделе "Поддержка"

При выборе теста в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 6.

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм[1]», «ДТлайт[2]», ДТ-96

| № блока | Температура, °С | Время | | Режим оптических измерений | Количество циклов |
|---|---|---|---|---|---|
| | | мин | с | | |
| 1 | 80,0 | 0 | 30 | | 1 |
| | 94,0 | 1 | 30 | | |
| | | | | | |
| 2 | 94,0 | 0 | 30 | | 5 |
| | 64,0 | 0 | 15 | √ | |
| | | | | | |
| 3 | 94,0 | 0 | 10 | | 45 |
| | 64,0 | 0 | 15 | √ | |
| | | | | | |
| 4 | 94 | 0 | 5 | | 1 |
| | | | | | |
| 5 | 10[3] | ... | ... | | Хранение |

**7.3** Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А[4]

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

7.3.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К и полимеразой ТехноТаq MAX в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Полимеразу ТехноТаq MAX следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.3 Добавьте в пробирку с ПЦР-буфером Стрим-К все содержимое второй пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К и двух пробирок с полимеразой ТехноТаq MAX. Закройте крышку пробирки.

7.3.4 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразой ТехноТаq MAX в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Смесь ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТаq MAX следует готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

7.3.5 Внесите аккуратно, без образования воздушных пузырей в восемь пробирок пустого стрипа, полученного в наборе по 140 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТаq MAX.

[1] – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6
[2] – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2
[3] – допускается хранение при температуре 25 °С
[4] – на примере использования дозирующего устройства ДТстрим (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) для дальнейшего проведения ПЦР на детектирующем амплификаторе

7.3.6 Промаркируйте пустые стрипы, полученные с набором реагентов.

7.3.7 Внесите в каждую пробирку стрипов по 100 мкл буфера для разведения ДНК.

7.3.8 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К–) в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.9 Добавьте аккуратно, без образования воздушных пузырей в соответствующие пробирки стрипов с буфером для разведения ДНК по 40 мкл анализируемых образцов, (К–) и (К+).

7.3.10 Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТаq MAX, с разведенными образцами, (К+) и (К–), а также пустые стрипы, микропланшет для ПЦР (384 лунки) на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации к прибору.

7.3.11 После завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим, аккуратно, не встряхивая, поместите микропланшет в подложку герметизирующего устройства ДТпак.

7.3.12 Проведите процедуру запечатывания микропланшет термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.13 Центрифугируйте микропланшет при RCF(g) 500 в течение 30 с.

7.3.14 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (384 лунки).

7.3.15 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР добавьте файл с параметрами теста[1]. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, 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.

[1] – инструкции по добавлению «готовых файлов с параметрами теста» находятся на сайте в разделе «Поддержка»

## 8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

**8.1** Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

**8.2** Детекция и учёт результатов осуществляются амплификатором детектирующим автоматически.

**8.3** После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. Анализ проводится автоматически программным обеспечением.

**8.4** На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название исследуемого показателя, результат по каждому показателю (количество и диаграмма, по которым можно судить о соотношении микроорганизмов в каждом из анализируемых образцов). Для Mycoplasma genitalium будет проведён качественный анализ. Пример приведен на рисунке 1.

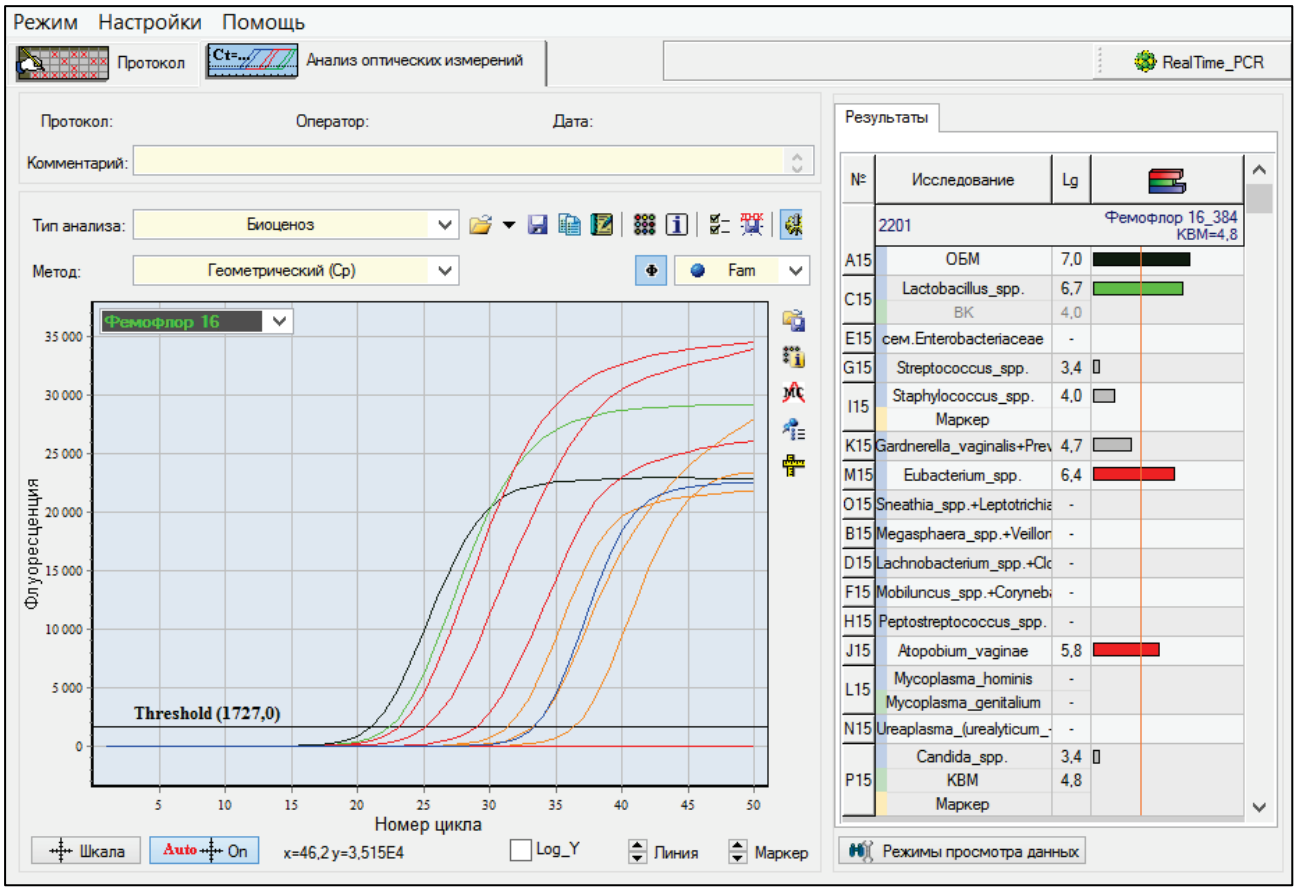



Рисунок 1 – Пример отображения результата исследования в окне программного обеспечения детектирующего амплификатора.

**8.5** По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт (см. приложение А).

## 9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

**9.1** Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

**9.2** После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом, Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца.

**9.3** При наличии в исследуемом образце ДНК микроорганизмов, выявляемых набором ФЕМОФЛОР®, в строке с названием микроорганизма указана цифра, обозначающая количество микроорганизма (десятичный логарифм концентрации), и гистограмма, в графическом виде отображающая количество данного микроорганизма и его соотношение с другими микроорганизмами.
Для Mycoplasma genitalium будет проведён качественный анализ и при наличии в исследуемом образце ДНК указанного наименования в таблице результатов будет отображён «+».

**9.4** В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ). Значение КВМ меньше 4,0 следует интерпретировать как недостаточное количество материала. В этом случае может потребоваться повторное взятие клинического материала.

**9.5** В положительном контрольном образце должен быть зафиксирован положительный результат: десятичный логарифм концентрации или «+». При получении отрицательных значений «–», результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

**9.6** В отрицательном контрольном образце должен быть получен отрицательный результат «–» для специфического продукта и положительный результат для внутреннего контроля. При получении другого значения, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

# 10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

**10.1** Транспортирование

Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

**10.2** Хранение

10.2.1 Набор реагентов следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX.

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

10.2.3 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, и смеси для амплификации Стрим следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

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 утверждённой инструкции по применению.

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

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

- компоненты набора (за исключением полимеразы ТехноТаq MAX) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- смеси, запечатанные парафином, и смеси для амплификации Стрим следует хранить в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора;
- полимеразу ТехноТаq MAX – при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

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 предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ФЕМОФЛОР®, 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

Пример отчета по исследованию с использованием набора реагентов ФЕМОФЛОР®.

Комплектация Фемофлор®16

## Исследование биоценоза урогенитального тракта
## Фемофлор 16

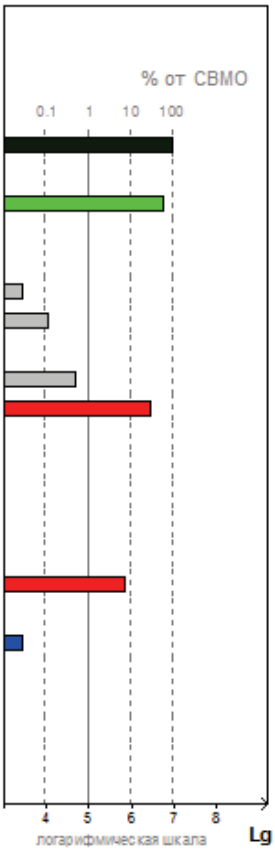
Логотип

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Информация о лаборатории

Идентификатор образца 2201

| № | Название исследования | Результаты | |
|---|---|---|---|
| | | Количественный | Относительный Lg(X/СВМО) |
| | Контроль взятия материала | $10^{4.8}$ | |
| 1 | Общая бактериальная масса | $10^{7.0}$ | |
| | НОРМОФЛОРА | | |
| 2 | Lactobacillus spp. | $10^{6.7}$ | -0.2 (52-70%) |
| | ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ | | |
| 3 | сем.Enterobacteriaceae | не выявлено | |
| 4 | Streptococcus spp. | $10^{3.4}$ | -3.5 (<0.1%) |
| 5 | Staphylococcus spp. | $10^{4.0}$ | -2.9 (0.1-0.1%) |
| | ОБЛИГАТНО-АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ | | |
| 6 | Gardnerella vaginalis+Prevotella bivia+Porphyromonas spp. | $10^{4.7}$ | -2.2 (0.5-0.7%) |
| 7 | Eubacterium spp. | $10^{6.4}$ | -0.5 (26-35%) |
| 8 | Sneathia spp.+Leptotrichia spp.+Fusobacterium spp. | не выявлено | |
| 9 | Megasphaera spp.+Veillonella spp.+Dialister spp. | не выявлено | |
| 10 | Lachnobacterium spp.+Clostridium spp. | не выявлено | |
| 11 | Mobiluncus spp.+Corynebacterium spp. | не выявлено | |
| 12 | Peptostreptococcus spp. | не выявлено | |
| 13 | Atopobium vaginae | $10^{5.8}$ | -1.1 ( 7- 9%) |
| | ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ | | |
| 14 | Candida spp. * | $10^{3.4}$ | |
| | МИКОПЛАЗМЫ | | |
| 15 | Mycoplasma hominis * | не выявлено | |
| 16 | Ureaplasma (urealyticum + parvum) * | не выявлено | |
| | ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ | | |
| 17 | Mycoplasma genitalium ** | не выявлено | |




* Абсолютный анализ Lg(X)
** Качественный анализ

Заключение

Умеренный Анаэробный дисбиоз

Символы, используемые при маркировке набора реагентов

| | |
|---|---|
| | Только для *in vitro* диагностики |
| | Температурный диапазон |
| | Количество определений |
| | Годен до |
| | Серия набора |
| | Дата производства |
| | Содержит инструкцию по применению |
| | Каталожный номер |
| | Адрес производителя |
| | Не допускается воздействие солнечного света |