

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин

« 22 » август 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*
в клиническом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Gardnerella vaginalis*-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	11
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
ВАРИАНТ FEP.....	14
СОСТАВ	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	16
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации.....	16
Б. Проведение амплификации.....	17
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	18
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	19
ВАРИАНТ FRT.....	21
СОСТАВ	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	23
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	23
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации.....	23
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	25
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	29
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	30
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	31
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Gardnerella vaginalis*-FL» предназначен для выявления ДНК *Gardnerella vaginalis* путем амплификации специфического фрагмента ДНК данного микроорганизма методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путем экстракции ДНК из соскобного отделяемого слизистой оболочки влагалища. Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций органов репродукции, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Gardnerella vaginalis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию фрагмента ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis* при помощи специфичных к нему праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта FRT - непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 вариантах.

Вариант FEP

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;
REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);
REF H-1042-1 / **VER** 22.04.22 / стр. 4 из 32

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-1000 (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 5 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 6 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 7 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл), «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4, 5, 6 и 7 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект»

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;

REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);

REF H-1042-1 / **VER** 22.04.22 / стр. 5 из 32

вариант FRT-1000 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (TCM)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 5 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 6 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (TCM)» 100 пробирок по 0,5 мл.

Форма 7 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл.

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4, 5, 6 и 7 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Набор для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
Соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	«Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (TCM)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FEP	2x10 ³ ГЭ/мл ¹
			«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ⁴ ГЭ/мл

¹ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в указанную транспортную среду.

Аналитическая специфичность

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов был использован клинический материал, полученный от пациентов Центрального научно-исследовательского кожно-венерологического института.

В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® *Gardnerella vaginalis*-EPH» (ПУ № ФСР 2008/03370).

Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® *Gardnerella vaginalis*-FL» в сравнении с референтным методом

Вид исследуемого материала	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® <i>Gardnerella vaginalis</i> -FL»		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
Соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	Всего исследовано 116 образцов	положительных	100	1
		отрицательных	0	15

Таблица 2

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® *Gardnerella vaginalis*-FL»

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ²	Диагностическая специфичность ³
Соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	100 %	93,8 %

² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

Вариант FEP Форма 1: REF B7-100-R0,5-FEP; REF H-1041-2-5; Форма 2: REF B7-100-R0,2-FEP;

REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: REF R-B7; REF H-1041-1-2; Форма 2: REF R-B7-F(RG,iQ);

REF H-1042-1 / VER 22.04.22 / стр. 7 из 32

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 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» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки,

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;

REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);

REF H-1042-1 / **VER** 22.04.22 / стр. 8 из 32

лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности формы 1–3 (вариант FEP, вариант FRT) набора реагентов безопасны.

При использовании по назначению форм 4–7 (вариант FEP, вариант FRT) набора реагентов и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов и Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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,

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;
REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);
REF H-1042-1 / **VER** 22.04.22 / стр. 9 из 32

почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514) или «Транспортная среда для мазков» (РУ № ФСР 2009/05515), или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1–3 (вариант FEP и вариант FRT).
2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1–3 (вариант FEP и вариант FRT).
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 F – от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP:

12. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), «Gradient Palm Cyclер» («Corbett Research», Австралия), «MAXYGENE» («Ахуген», США), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») или аналогичные).
13. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
14. Пластиковая пипетка для минерального масла (для работы с «ПЦР-комплект» вариант FEP-1000).

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT:

15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT (например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия), «iQ5» («Bio-Rad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
16. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, «Ахуген», США) - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, «Ахуген», США), или пробирки для ПЦР к «Rotor-Gene», объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, «Corbett Research», Австралия; «Qiagen», Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Материалом для исследования служит соскобное отделяемое слизистой оболочки влагалища.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Потенциально интерферирующие вещества

Влияние потенциально интерферирующих веществ было изучено на модельных образцах. Модельные образцы были приготовлены разведением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК *Gardnerella vaginalis*, до концентрации 1×10^4 ГЭ/мл в транспортной среде с муколитиком (ТСМ) с соскобным отделяемым слизистой оболочки влагалища с добавлением и без добавления потенциально интерферирующих веществ.

Для оценки влияния высокой концентрации экзогенного вещества использовали препараты: «Мирамистин» («Инфамед», Россия); «Хлоргексидина биглюконат», раствор для наружного применения 0,05% («Биоген НПЦ», Россия); «Клотримазол», крем 1% («Озон», Россия); «Метрогил», гель вагинальный (метронидазол 1%), («Юник Фармасьютикал Лабораториз», Индия); «Полижинакс», капсулы вагинальные («Иннотек Интернациональ», Франция); «Макмирор комплекс», капсулы вагинальные (Polichem Srl, Италия); «Hasico For Women», гель-смазка («ЭМАНСИ», Россия); «Contex Silk», интимный гель-смазка силиконовый (Contex, Чехия), «Play Feel», гель-смазка для повышения чувствительности (Durex, Таиланд) в различных концентрациях (см. табл. 3). Концентрацию экзогенного вещества определяли, как объем препарата к объему исследуемого образца. Максимальная концентрация экзогенного вещества соответствовала максимально возможному объему вагинального мазка, помещенного в транспортную среду, при заборе клинического

материала зондами, рекомендованными к использованию.

Для оценки влияния эндогенных веществ использовали гликоген, гемоглобин, лактоферрин, муцин в различных концентрациях (см. табл. 3). Концентрации эндогенных веществ были определены с учетом литературных данных по изучению ингибиторов ПЦР. Самая высокая концентрация эндогенных веществ превышала в два раза концентрацию ингибирующих ПЦР веществ согласно литературным данным.

Таблица 3

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

ВАРИАНТ FEP

ВАРИАНТ FEP СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» - **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Gardnerella vaginalis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон-red ⁵	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ⁶	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-1000 – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» - **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Gardnerella vaginalis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	1100 пробирок объемом 0,5 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	5,5	2 флакона
ПЦР-смесь-Фон-red ⁵	Прозрачная жидкость красного цвета	2,5	1 флакон
Минеральное масло для ПЦР ⁶	Бесцветная вязкая жидкость	40	1 флакон
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

⁵ Реагент используется при исследовании проб ДНК, выделенных с помощью наборов «ДНК-сорб-АМ» или «ДНК-сорб-В».

⁶ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия) и комплектуется только в состав Форм 1, 3, 4, 5.

ВАРИАНТ FEP

Комплект реагентов рассчитан на проведение 1100 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100⁷ – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала - **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

К комплекту реагентов «ДНК-сорб-АМ» прилагаются следующие реагенты:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)⁸:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)	Прозрачная жидкость розового цвета	0,5	100 пробирок

Транспортная среда для мазков⁹:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых (клинических) образцов;
- Проведение амплификации.

⁷ Входит в состав форм комплектации 4, 5, 6 и 7.

⁸ Входит в состав форм комплектации 4 и 6.

⁹ Входит в состав форм комплектации 5 и 7.

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;

REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);

- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

При использовании форм выпуска набора 4–7 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL *Gardnerella vaginalis* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FL *Gardnerella vaginalis* на поверхность застывшего воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL *Gardnerella*

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;

REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);

REF H-1042-1 / **VER** 22.04.22 / стр. 16 из 32

vaginalis.

3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. Приготовить образец **«Фон»**. Для этого в пробирку с **ПЦР-смесью-1-FL *Gardnerella vaginalis*** на поверхность застывшего воска внести **20 мкл ПЦР-смеси-Фон-red**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

ВНИМАНИЕ! Реагент **ПЦР-смесь-Фон-red** используется при исследовании проб ДНК, выделенных с помощью комплектов «ДНК-сорб-АМ» или «ДНК-сорб-В». При использовании других комплектов реагентов для экстракции ДНК, рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, необходимо следовать инструкции к используемому набору.

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных путем экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из ОКО.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования **«АмплиСенс-1-FEP»** (см. табл. 3).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Программа «АмплиСенс-1-FEP»

Цикл	«Терцик»			«GeneAmp PCR System 2700»			«Gradient Palm Cycler», «MAXYGEN»		
	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Циклы
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

Примечание. Программы термоциклирования для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией».

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis*.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP; **REF** H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ); **REF** H-1042-1 / **VER** 22.04.22 / стр. 18 из 32

сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, полученных путем экстракции из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Gardnerella vaginalis* **обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения.
- ДНК *Gardnerella vaginalis* **не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения, и сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения.

Если для пробы получен **невалидный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 4.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	HEX	
В-	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения	Выше порогового значения	«-» или «ОК»
К-	ПЦР	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения	«нд» или «ОК»
К+	ПЦР	Выше порогового значения	Выше порогового значения	«+» или «ОК»

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналу FAM ниже порогового значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Gardnerella vaginalis*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу FAM выше порогового значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Gardnerella vaginalis*, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВАРИАНТ FRT

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Gardnerella vaginalis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Gardnerella vaginalis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-1000 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

ВАРИАНТ FRT

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Gardnerella vaginalis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	10 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 1100 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100¹⁰ – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

К комплекту реагентов «ДНК-сорб-АМ» прилагаются следующие реагенты:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)¹¹

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)	Прозрачная жидкость розового цвета	0,5	100 пробирок

¹⁰ Входит в состав форм комплектации 4, 5, 6 и 7.

¹¹ Входит в состав форм комплектации 4 и 6.

Транспортная среда для мазков¹²

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL.

При использовании форм выпуска набора 4–7 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**А. Подготовка пробирок для проведения амплификации**

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

¹² Входит в состав форм комплектации 5 и 7.

ВАРИАНТ FRT

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

A1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Gardnerella vaginalis*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *Gardnerella vaginalis***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из ОКО.

A2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и FRT-1000 F

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

1. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT**. Перемешать содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смесь-1-FL *Gardnerella vaginalis***, **ПЦР-смесь-2-FRT**, полимеразы (**TaqF**) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций (включая 2 контроля ПЦР) смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FL**

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;

REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);

REF H-1042-1 / **VER** 22.04.22 / стр. 24 из 32

***Gardnerella vaginalis*, 5,0*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF).**

4. Перемешать подготовленную смесь и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1» (см. табл. 5).

Таблица 5

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ¹³			Приборы планшетного типа ¹⁴		
	Температура, °С	Время	Число повторов циклов	Температура, °С	Время	Число повторов циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам

¹³ например, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» или аналогичные

¹⁴ например, «iCycler», «iQ5», «Mx3000P», «Mx3000», «ДТ-96» или аналогичные.

Вариант FEP Форма 1: **REF** B7-100-R0,5-FEP; **REF** H-1041-2-5; Форма 2: **REF** B7-100-R0,2-FEP;

REF H-1042-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-B7; **REF** H-1041-1-2; Форма 2: **REF** R-B7-F(RG,iQ);

для флуорофоров FAM и JOE (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам)

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis*,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Gardnerella vaginalis* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (C_t), не превышающее значение порогового цикла, полученное для положительного контроля ПЦР (К+), или превышающее его не более чем на 2 цикла. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- ДНК *Gardnerella vaginalis* не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM не определено (отсутствует) значение порогового цикла (*Ct*) (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*), не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла (*Ct*) по каналу для флуорофора FAM, и по каналу для флуорофора JOE значение (*Ct*) также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 6).

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE
В-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Gardnerella vaginalis*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM зафиксировано значение порогового цикла (*Ct*), необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Gardnerella vaginalis*, начиная с этапа экстракции ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и FRT-1000 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Gardnerella vaginalis* хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru¹⁵.

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

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

¹⁵ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n тестов



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации»;
- 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» (п. 5.2.2);
- 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»;
- СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;
- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».