

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Лакто-скрин» по ТУ 21.20.23-201-09286667-2023

## АмплиПрайм® Лакто-скрин

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



---

## ОГЛАВЛЕНИЕ

---

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	3
НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ .....	3
ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. НАЗНАЧЕНИЕ .....	6
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА .....	6
2.1.Формы выпуска, состав и комплектность .....	6
2.2.Принцип метода .....	8
2.3.Прослеживаемость значений калибраторов K1 Lacto, K2 Lacto .....	9
2.4.Техническое обслуживание и ремонт .....	9
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА .....	9
3.1.Внутренний контроль качества .....	9
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	11
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ .....	11
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ .....	13
6.1.Взятие исследуемого материала .....	13
6.2.Экстракция ДНК из исследуемых образцов .....	13
6.3.Аmplификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов .....	13
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ .....	15
7.1.Отделяемое слизистой оболочки влагалища .....	15
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	16
8.1.Экстракция ДНК из исследуемого материала .....	16
8.2.Подготовка реагентов для амплификации .....	16
8.3.Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции .....	17
8.4.Анализ и вычисление результатов .....	18
8.5.Интерпретация результатов .....	19
8.6.Возможные ошибки и рекомендации по их решению .....	21
8.7.Диагностическое значение полученного результата .....	21
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА .....	22
9.1.Предел обнаружения .....	22
9.2.Линейный диапазон измерения и предел измерения .....	22
9.3.Аналитическая специфичность .....	22
9.4.Воспроизводимость и повторяемость измерения .....	23
9.5.Правильность измерения .....	24
9.6.Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность .....	25
9.7.Оценка влияния интерферирующих веществ .....	26
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА .....	27
10.1.Срок годности .....	27
10.2.Транспортирование .....	27
10.3.Хранение .....	27
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....	27
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....	28

---

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

---

Сt	– Cycle threshold (пороговый цикл)
БВ	– бактериальный вагиноз
ВКО	– внутренний контрольный образец
ГЭ	– геномные эквиваленты
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
К1	– калибровочный образец 1
К2	– калибровочный образец 2
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

---

## НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

---

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Лакто-скрин» по ТУ 21.20.23-201-09286667-2023.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Лакто-скрин», а также сокращение Набор реагентов.

Из всего разнообразия лактобацилл в составе влагалищной микрофлоры чаще всего доминирует один из четырех видов лактобактерий (68,9%): в первую очередь *L. crispatus* (18,6%) или *L. iners* (33,1%), *L. gasseri*, *L. jensenii*. Преобладание двух-трех видов лактобактерий одновременно наблюдалось у 24,9% женщин (Зорников, 2017). Исследования видового разнообразия лактобактерий в нормофлоре и различных патологиях показало преобладание *L. crispatus* в вагинальном биотопе здоровых женщин. *L. iners*, в свою очередь, выявляется как у здоровых женщин, так и при бактериальном вагинозе (БВ), в отличие от *L. crispatus*, который выявляется преимущественно в нормофлоре (Petrova et al., 2015). В физиологическом микробиоценозе чаще обнаруживается видовое разнообразие лактобацилл (выявление более 2 видов), по сравнению с дисбиозом влагалища (Будиловская, 2017). Воспалительные заболевания нижних отделов репродуктивной системы женщин и БВ могут сопровождаться повышением так же доли *L. gasseri* в составе лактофлоры (Бурменская и др., 2014, Мелкумян, 2013).

*L. iners* может быть предиктором преждевременных родов и невынашивания беременности (Синякова и др., 2019), а также послеродовых осложнений, в частности, у женщин с нарушением инволюции матки чаще выявлялся *L. iners* (Дадаева и др., 2021).

Есть предположения, что *L. iners* выступают в качестве триггера развития вагинального дисбиоза (Petrova et al., 2017). Преобладание *L. iners* ассоциировано с более высоким уровнем провоспалительных факторов, в частности, интерлейкин 1а, интерлейкин-18, фактор торможения миграции макрофагов, фактор некроза опухоли, которые ответственны за развитие вагинального воспалительного процесса (De Seta et al., 2019).

Защитный эффект лактобактерий от потенциально патогенных бактерий проявляется в снижении вагинального pH за счет синтеза молочной кислоты, при этом способность бактерий синтезировать молочную кислоту отличается в зависимости от вида лактобактерий (Годовалов и др., 2019). *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii* продуцируют D и L изомеры молочной кислоты при ферментировании гликогена, тогда как *L. iners* – только L-изомер, так как у нее отсутствует ген, кодирующий D-лактат дегидрогеназу (France et al., 2016). Разные изомеры оказывают различный эффект на иммунную систему хозяина (Witkin et al.), кроме того, показано, что D-изомеры оказывают более выраженное ингибирующее действие на экзогенные бактерии, по сравнению с L-молочной кислотой (Tachedjian et al., 2017). Таким образом, *L. iners* оказываются менее эффективными в предотвращении проникновения патогенных бактерий (Basavaprabhu et al., 2020).

Таким образом, выявление более двух видов лактобактерий, один из которых *L. crispatus* свидетельствует о нормофлоре, тогда как преобладание *L. iners* наблюдается при воспалительных заболеваниях нижних отделов репродуктивной системы, БВ, может быть предиктором невынашивания беременности и послеродовых осложнений.

### Список литературы

1. Зорников Д.Л. Особенности видового состава вагинальной лактофлоры и возможности коррекции дисбиоза влагалища у женщин репродуктивного возраста: Автореф. дисс. канд. мед. наук. – Челябинск, 2017. – 23с.
2. Будилова О.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е.Н., Сафронова М.М., Савичева А.М. Видовое разнообразие вагинальных лактобацилл в норме и при дисбиотических состояниях. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2017. 66(2):24-32.
3. Petrova M. I., Lievens E., Malik S., Imholz N., Lebeer S. *Lactobacillus* Species as Biomarkers and Agents That can Promote Various Aspects of Vaginal Health. *Front. Physiol.* 2015. 6(81).

4. Бурменская О.В., Байрамова Г.Р., Непша О.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Абакарова П.Р., Стрельченко Д.А., Кряжева В.С., Сухих Г.Т. Видовой состав лактобактерий при неспецифических вагинитах и бактериальном вагинозе и его влияние на локальный иммунитет. *Акушерство и гинекология*. 2014.
5. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Муллабаева С.М., Завьялова М.Г. Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных. *Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия*. 2013; 15(1):72-79.
6. Синякова А.А., Шипицына Е.В., Будилковская О.В. и др. Клинико-anamнестические и микробиологические предикторы невынашивания беременности. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2019. Т. 68. № 2. С. 59-70.
7. Дадаева Д.Г., Будилковская О.В., Крысанова А.А., Хуснутдинова Т.А., Савичева А.М., Коган И.Ю. Значение вагинальных лактобацилл в восстановлении микробиоценоза влагалища у родильниц в раннем послеродовом периоде в зависимости от способа родоразрешения. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2021. Т. 70. № 4. С. 15-23.
8. Petrova M. I., Reid G., Vaneechoutte M., Lebeer S. *Lactobacillus Iners*: Friend or Foe? *Trends Microbiol*. 2017. 25 (3): 182-191.
9. De Seta F., Campisciano G., Zanotta N., Ricci G., Comar M. The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Front. Microbiol*. 2019. 10, 2451.
10. Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И. Характеристики штаммов лактобактерий, обладающие диагностической значимостью в гинекологической практике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019. 64(2):111-116.
11. France M. T., Mendes-Soares H., Forney L. J. Genomic Comparisons of *Lactobacillus Crispatus* and *Lactobacillus Iners* Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. *Appl. Environ. Microbiol*. 2016. 82 (24), 7063-7073.
12. Tachedjian G., Aldunate M., Bradshaw C. S., Cone R. A. The Role of Lactic Acid Production by Probiotic *Lactobacillus* Species in Vaginal Health. *Res. Microbiol*. 2017 168 (9-10), 782-792.
13. Basavaprabhu H. N., Sonu K. S., Prabha R. Mechanistic Insights Into the Action of Probiotics Against Bacterial Vaginosis and its Mediated Preterm Birth: An Overview. *Microb. Pathog*. 2020. 141.

---

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

---

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® Лакто-скрин» предназначен для выявления и количественного определения ДНК *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii* в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение ДНК *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii* методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для скрининга биологического материала, для оценки микрофлоры урогенитального тракта женщин. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Популяционные и демографические аспекты: Применение набора реагентов предназначено для исследования биологического материала, полученного от лиц женского пола.

---

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

---

### 2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор реагентов выпускается в двух формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все формы предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

**Форма выпуска 1** включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

**Форма выпуска 2** включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

## Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
<b>Форма выпуска 1</b>			
ПЦР-смесь Lacto	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
K1 Lacto	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 Lacto	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
<b>Форма выпуска 2</b>			
ПЦР-смесь Lacto	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) <sup>1</sup>	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
K1 Lacto	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 Lacto	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

## Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1 или 2)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде <sup>2</sup> на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-

<sup>1</sup> Пробирки с голубым парафином не используются.

<sup>2</sup> Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

## 2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL<sup>3</sup>) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов (*L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jensenii*) и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией сигнала в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, 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 с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii* основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят совместно с калибраторами K1 Lacto и K2 Lacto – образцами с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Концентрация ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii* определяется, как абсолютные значения концентраций ДНК микроорганизмов, отражающие количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в 1 мл биологического образца (ГЭ/мл).

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термоллабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится 5 реакций – амплификация участков ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и последовательности ВКО. Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

---

<sup>3</sup> ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

## Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G <sup>4</sup>	ROX	Сy5	Сy5.5
ДНК-мишень	ДНК <i>L. iners</i>	ДНК <i>L. gasseri</i>	ДНК <i>L. crispatus</i>	ДНК <i>L. jensenii</i>	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)
Область амплификации	<i>Tuf gene</i>	<i>Tuf gene</i>	<i>Tuf gene</i>	<i>Tuf gene</i>	Искусственно синтезированная последовательность

**2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 Lacto, K2 Lacto**

Измерение значений концентрации калибраторов K1 Lacto и K2 Lacto производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов K1 Lacto и K2 Lacto составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

**2.4. Техническое обслуживание и ремонт**

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

**3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА****3.1. Внутренний контроль качества****3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования**

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец экстракции (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать: отрицательный контроль ПЦР (К-) и положительные контроли (K1 Lacto и K2 Lacto). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец экстракции (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружены ДНК *L. iners* и/или *L. gasseri* и/или *L. crispatus* и/или *L. jensenii* и контроля, начиная с этапа экстракции.

<sup>4</sup> Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

Отрицательный контроль ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа амплификации, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружены ДНК *L. iners* и/или *L. gasseri* и/или *L. crispatus* и/или *L. jensenii* и контроля, начиная с этапа амплификации.

В качестве положительного контроля используются реагенты K1 Lacto и K2 Lacto, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

### **3.1.2. Анализ калибровки**

Количественная оценка концентрации ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii* в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов K1 Lacto и K2 Lacto. Исследование калибровочных образцов K1 Lacto и K2 Lacto проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов K1 Lacto и K2 Lacto и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов K1 Lacto и K2 Lacto и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если эффективность калибровки выходит за пределы граничных значений, необходимо повторить исследование с этапа ПЦР.

### **3.1.3. Контроль ингибирования**

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО, который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

### **3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации**

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

---

## 4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL. Без использования ВКО-FL невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

4.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

4.8. Не применять набор при нарушении целостности упаковки и с истекшим сроком годности.

---

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

---

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического 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 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».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку<sup>5</sup>, биологический материал<sup>6</sup>, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

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

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

<sup>5</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

<sup>6</sup> Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

## **6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

### **6.1. Взятие исследуемого материала**

6.1.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (отделяемое слизистой оболочки влагалища), содержащая буферно-солевой раствор с муколитиком, консервантом и стабилизатором (например, «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм ТСМ» (РУ № ФСР 2012/14205) или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.2. Зонд для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек (отделяемое слизистой оболочки влагалища) однократного применения, стерильный. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

### **6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

6.2.1. Набор реагентов для экстракции нуклеиновых кислот, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (отделяемое слизистой оболочки влагалища) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошел набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм® ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043).

6.2.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

### **6.3. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов**

6.3.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при работе с формой выпуска 1):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.3.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.3.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.3.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.3.5. Центрифуга-вортекс.

6.3.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при работе с формой выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.3.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного либо планшетного типа, зарегистрированные в РФ и соответствующие следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 со следующими характеристиками:

Таблица 4

**Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции**

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690
Cy5.5	660	690	705	750

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры  $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$ ;
- скорость нагрева не менее 2 °C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

6.3.9. Холодильник от 2 до 8 °C.

6.3.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.3.11. Емкость для сброса наконечников.

---

## 7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

---

Материалом для исследования служит:

- отделяемое слизистой оболочки влагалища.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

### 7.1. Отделяемое слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой в соответствии инструкцией по применению зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Рабочую поверхность зонда поместить в транспортную среду, обломав пластиковую основу. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

**ВНИМАНИЕ!** Во избежание контаминации, нельзя обрезать зонд ножницами!

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинично-диагностической лаборатории<sup>7</sup>:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

### 8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

**ВНИМАНИЕ!** При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

**ВНИМАНИЕ!** Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем реагента ВКО-FL – **10 мкл** в пробирку для ОКО, а также в каждую пробирку с исследуемыми образцами;
- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **100 мкл** (согласно инструкции по применению к используемому набору для экстракции НК).

### 8.2. Подготовка реагентов для амплификации

#### 8.2.1. При использовании формы выпуска 1

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

**ВНИМАНИЕ!** В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Lacto** и **ПЦР-буфера-Н**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

**Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси**

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Lacto	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	$5,0 \cdot (N+1)$	

<sup>7</sup> Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

8.2.1.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Lacto** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

8.2.1.3. Приготовить реакцию смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.1.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

**ВНИМАНИЕ!** Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

## **8.2.2. При использовании формы выпуска 2**

8.2.2.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью Lacto** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.2.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.2.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

## **8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции**

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакцию смесь.

**ВНИМАНИЕ!** При ручном анализе программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью контрольные образцы.

### **При проведении качественного анализа:**

а) положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **K2** внести **10 мкл K2 Lacto**.

б) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

### **При проведении количественного анализа:**

а) Образец **K1** – в одну пробирку внести **10 мкл K1 Lacto**.

б) Образец **K2** – в одну пробирку внести **10 мкл K2 Lacto**.

в) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

г) отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

**Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5	

**Примечание** - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

8.3.4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

8.3.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.7. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

**8.4. Анализ и вычисление результатов**

**ВНИМАНИЕ!** При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

**ВНИМАНИЕ!** Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по пяти каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

### Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	ДНК <i>L. iners</i>	ДНК <i>L. gasseri</i>	ДНК <i>L. crispatus</i>	ДНК <i>L. jensenii</i>	ДНК ВКО

### 8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- в качественном формате вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 10;

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 9 и 10 соответственно.

Таблица 8

### Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM, R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 не определено или определено выше граничного</b> <sup>8</sup>	<b>Невалидный!</b> Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 определено не выше граничного</b> , и по каналу для флуорофора <b>Cy5.5 определено не выше граничного</b> . При этом кривые флуоресценции данной пробы по данным каналам пересекают пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	<b>ДНК <i>L. iners</i> и/или <i>L. gasseri</i> и/или <i>L. crispatus</i> и/или <i>L. jensenii</i> обнаружена</b>
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 не определено или определено выше граничного</b> , а по каналу для флуорофора <b>Cy5.5 определено не выше граничного</b>	<b>ДНК <i>L. iners</i> и/или <i>L. gasseri</i> и/или <i>L. crispatus</i> и/или <i>L. jensenii</i> не обнаружена</b>

<sup>8</sup> Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов  
при проведении количественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 не определено или определено выше граничного <sup>9</sup>	<b>Невалидный!</b> Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного	<b>ДНК <i>L. iners</i> и/или <i>L. gasseri</i> и/или <i>L. crispatus</i> и/или <i>L. jensenii</i> обнаружена в концентрации менее <math>4 \times 10^3</math> ГЭ/мл</b>
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 находится в пределах линейного диапазона измерения набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного	<b>ДНК <i>L. iners</i> и/или <i>L. gasseri</i> и/или <i>L. crispatus</i> и/или <i>L. jensenii</i> обнаружена в концентрации <math>X \times 10^Y</math> ГЭ/мл</b>
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного	<b>ДНК <i>L. iners</i> и/или <i>L. gasseri</i> и/или <i>L. crispatus</i> и/или <i>L. jensenii</i> обнаружена в концентрации более <math>1 \times 10^9</math> ГЭ/мл</b>
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 не определено или определено выше граничного, а по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного	<b>ДНК <i>L. iners</i> и/или <i>L. gasseri</i> и/или <i>L. crispatus</i> и/или <i>L. jensenii</i> не обнаружена</b>

Таблица 10

**Критерии валидности для контрольных образцов**

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует				Определено значение Ct не выше граничного <sup>9</sup>
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует				
K1 Lacto (K1)	Определено значение Ct				
K2 Lacto (K2)	Определено значение Ct не выше граничного				
K1 Lacto (K1) K2 Lacto (K2)	Показатель эффективности (E) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2				

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (Ct) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 Lacto и K2 Lacto происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

**ВНИМАНИЕ!** Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

<sup>9</sup> Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

**ВНИМАНИЕ!** Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® Лакто-скрин» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

## **8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению**

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.6.3. Если показатель эффективности E для калибраторов не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

8.6.4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие и исследование образца.

## **8.7. Диагностическое значение полученного результата**

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

## 9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 9.1. Предел обнаружения<sup>10</sup>

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой достоверной вероятностью (см. таблицу 11).

Значения характеристики, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 11

Предел обнаружения набора

Микроорганизм	Предел обнаружения по Probit 95%, ГЭ/мл	95%-ый доверительный интервал, ГЭ/мл
<i>L. iners</i>	$1 \times 10^3$	$0,823 \times 10^3 - 1,310 \times 10^3$
<i>L. gasseri</i>	$1 \times 10^3$	$0,819 \times 10^3 - 1,270 \times 10^3$
<i>L. crispatus</i>	$1 \times 10^3$	$0,848 \times 10^3 - 1,400 \times 10^3$
<i>L. jensenii</i>	$1 \times 10^3$	$0,812 \times 10^3 - 1,390 \times 10^3$

### 9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор «АмплиПрайм® Лакто-скрин» дает линейный ответ, находится в пределах от  $4 \times 10^3$  до  $1 \times 10^9$  ГЭ/мл. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

### 9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® Лакто-скрин» обнаруживает только фрагменты ДНК *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов, вирусов (см. таблицу 12) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК выявляемых микроорганизмов.

Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми микроорганизмами при тестировании ДНК данных микроорганизмов.

Таблица 12

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Neisseria sicca</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Neisseria subflava</i>	HSV I
<i>Streptococcus agalactiae</i>	HSV II
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CMV
<i>Staphylococcus aureus</i>	HHV6
<i>Candida albicans</i>	EBV
<i>Chlamydia trachomatis</i>	—

<sup>10</sup> Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемых возбудителей, при которой 95% тестов дают положительный результат).

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, вирусов и геномной ДНК человека, а также ДНК выявляемых микроорганизмов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

#### 9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов в четырех концентрациях (см. таблицу 13-16). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Таблица 13

##### Повторяемость измерения на пределе обнаружения набора

Микроорганизм	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее значение порогового цикла, $C_{тп}$	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<b>Форма выпуска 1</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>3</sup>	34,49	0,16	0,45
<i>L. gasseri</i>		34,33	0,13	0,37
<i>L. crispatus</i>		34,00	0,17	0,50
<i>L. jensenii</i>		34,63	0,16	0,47
<b>Форма выпуска 2</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>3</sup>	34,54	0,15	0,43
<i>L. gasseri</i>		34,27	0,15	0,45
<i>L. crispatus</i>		34,00	0,14	0,43
<i>L. jensenii</i>		34,62	0,16	0,47

Таблица 14

##### Повторяемость измерения в пределах линейного диапазона набора

Микроорганизм	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log <sub>10</sub>	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<b>Форма выпуска 1</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,12	0,11	1,20
	1×10 <sup>6</sup>	6,02	0,05	0,80
	4×10 <sup>3</sup>	3,69	0,08	2,28
<i>L. gasseri</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,07	0,04	0,43
	1×10 <sup>6</sup>	6,03	0,04	0,74
	4×10 <sup>3</sup>	3,71	0,04	1,15
<i>L. crispatus</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,00	0,07	0,73
	1×10 <sup>6</sup>	6,02	0,05	0,76
	4×10 <sup>3</sup>	3,77	0,04	1,12
<i>L. jensenii</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,08	0,06	0,62
	1×10 <sup>6</sup>	6,02	0,04	0,73
	4×10 <sup>3</sup>	3,50	0,07	1,90
<b>Форма выпуска 2</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,11	0,11	1,20
	1×10 <sup>6</sup>	6,04	0,05	0,85
	4×10 <sup>3</sup>	3,68	0,06	1,68
<i>L. gasseri</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,06	0,03	0,33
	1×10 <sup>6</sup>	6,02	0,05	0,80
	4×10 <sup>3</sup>	3,69	0,03	0,80
<i>L. crispatus</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,00	0,07	0,78
	1×10 <sup>6</sup>	6,03	0,04	0,72
	4×10 <sup>3</sup>	3,76	0,05	1,26
<i>L. jensenii</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,10	0,06	0,70
	1×10 <sup>6</sup>	6,02	0,03	0,58
	4×10 <sup>3</sup>	3,48	0,05	1,39

**Воспроизводимость измерения на пределе обнаружения набора**

Микроорганизм	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее значение порогового цикла, Ст <sub>ср</sub>	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<b>Форма выпуска 1</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>3</sup>	34,50	0,15	0,43
<i>L. gasseri</i>		34,32	0,15	0,43
<i>L. crispatus</i>		34,06	0,19	0,57
<i>L. jensenii</i>		34,66	0,15	0,43
<b>Форма выпуска 2</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>3</sup>	34,49	0,16	0,47
<i>L. gasseri</i>		34,30	0,15	0,43
<i>L. crispatus</i>		34,09	0,18	0,52
<i>L. jensenii</i>		34,63	0,15	0,42

Таблица 16

**Воспроизводимость измерения в пределах линейного диапазона набора**

Микроорганизм	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log <sub>10</sub>	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<b>Форма выпуска 1</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,04	0,05	0,51
	1×10 <sup>6</sup>	6,00	0,04	0,68
	4×10 <sup>3</sup>	3,70	0,08	2,08
<i>L. gasseri</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,06	0,04	0,40
	1×10 <sup>6</sup>	6,03	0,05	0,88
	4×10 <sup>3</sup>	3,67	0,07	1,96
<i>L. crispatus</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,00	0,07	0,74
	1×10 <sup>6</sup>	6,02	0,05	0,80
	4×10 <sup>3</sup>	3,75	0,05	1,27
<i>L. jensenii</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,03	0,03	0,38
	1×10 <sup>6</sup>	6,04	0,04	0,60
	4×10 <sup>3</sup>	3,57	0,05	1,41
<b>Форма выпуска 2</b>				
<i>L. iners</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,02	0,05	0,51
	1×10 <sup>6</sup>	6,01	0,04	0,72
	4×10 <sup>3</sup>	3,68	0,07	2,01
<i>L. gasseri</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,06	0,03	0,36
	1×10 <sup>6</sup>	6,03	0,05	0,80
	4×10 <sup>3</sup>	3,64	0,06	1,62
<i>L. crispatus</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,02	0,05	0,60
	1×10 <sup>6</sup>	6,02	0,05	0,87
	4×10 <sup>3</sup>	3,75	0,04	1,03
<i>L. jensenii</i>	1×10 <sup>9</sup>	9,03	0,04	0,47
	1×10 <sup>6</sup>	6,03	0,04	0,68
	4×10 <sup>3</sup>	3,54	0,06	1,57

### 9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 80 повторях (см. таблицу 17).

## Правильность измерения

Микроорганизм	Среднее значение измерения, log <sub>10</sub>	Установленное значение концентрации, log <sub>10</sub>	Систематическая погрешность (В)	
			log <sub>10</sub>	%
<i>L. iners</i>	5,68	5,70	0,02	0,4
<i>L. gasseri</i>	5,71		0,01	0,1
<i>L. crispatus</i>	5,71		0,01	0,2
<i>L. jensenii</i>	5,69		0,01	0,2

## 9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин» были использованы 250 образцов отделяемого слизистой оболочки влагалища.

В качестве методик сравнения использовались:

- набор сравнения «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Бактериальный вагиноз» (РУ № РЗН 2016/3619);
- культуральное исследование с идентификацией полученной чистой культуры на масс-спектрометре Vitek MS методом MALDI-TOF;
- система капельной цифровой ПЦР QX100 (QX100 droplet digital PCR).

Результаты тестирования набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин» в сравнении с методиками сравнения приведены в таблице 18.

Таблица 18

## Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин»

Исследуемые образцы			Результаты тестирования		
Тип биоматериала	Микроорганизм	Количество	Образцы	Тестируемый набор	Методики сравнения
				АмплиПрайм® Лакто-скрин	
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	<i>L. iners</i>	250	Положительных	139	139
			Отрицательных	111	111
	<i>L. gasseri</i>		Положительных	62	62
			Отрицательных	188	188
	<i>L. crispatus</i>		Положительных	124	124
			Отрицательных	126	126
	<i>L. jensenii</i>		Положительных	89	89
			Отрицательных	161	161

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 19.

**Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® Лакто-скрин»**

Тип биоматериала	Микроорганизм	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	<i>L. iners</i>	100 % (96,73 % – 100 %)	100 % (97,38 % – 100 %)
	<i>L. gasseri</i>	100 % (98,06 % – 100 %)	100 % (94,22 % – 100 %)
	<i>L. crispatus</i>	100 % (97,11 % – 100 %)	100 % (97,07 % – 100 %)
	<i>L. jensenii</i>	100 % (97,73 % – 100 %)	100 % (95,94 % – 100 %)

**9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ**

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 20, в максимально возможной концентрации.

Таблица 20

**Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин»**

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
отделяемое слизистой оболочки влагалища	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	мочевина	3,3 мг/мл
	лубрикант (интимный гель-смазка Contex Silk на силиконовой основе)	0,05 мг/мл
	лубрикант (интимный гель-смазка Durex)	0,05 мг/мл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	хлоргексидин	0,1 %

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации  $1,0 \times 10^8$  ГЭ/мл.

---

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

---

### 10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

### 10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 месяцев всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

### 10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

**ВНИМАНИЕ!** Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Lacto и ПЦР-буфера-Н, входящих в состав формы выпуска 1, хранению не подлежит.

---

## 11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

---

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® Лакто-скрин» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: [www.nextbio.ru](http://www.nextbio.ru).

## 12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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