

Центральная администрация
Финансово-кредитной службы
«ИНТЕХ»
Co. Ltd.
г. МОСКВА

А.Ю.Наумов

ИНСТРУКЦИЯ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Таблица 1.

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	НЕРАСКАПАННЫЙ-PB-60	1. Реакционная смесь ОБМ 2. Реакционная смесь GLA 3. Реакционная смесь MPC 4. Реакционная смесь EBM 5. Таq-полимераза 6. Разбавитель 7. ПКО ФЕМОСКРИН	1 пробирка – 480 мкл 1 пробирка – 480 мкл 1 пробирка – 480 мкл 1 пробирка – 480 мкл 2 пробирки по 50 мкл 3 пробирки по 2 мл 2 пробирки по 200 мкл
2	TwoStep-PB-96, 24 теста	1. Реакционная смесь ОБМ 2. Реакционная смесь GLA 3. Реакционная смесь MPC 4. Реакционная смесь EBM 5. Раствор Таq-полимеразы 6. Разбавитель 7. ПКО ФЕМОСКРИН	24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 1 пробирка - 800 мкл 1 пробирка - 200 мкл 1 пробирка - 200 мкл
3	TwoStep-PB-96, 48 тестов	1. Реакционная смесь ОБМ 2. Реакционная смесь GLA 3. Реакционная смесь MPC 4. Реакционная смесь EBM 5. Раствор Таq-полимеразы 6. Разбавитель 7. ПКО ФЕМОСКРИН	48 пробирок по 21 мкл 48 пробирок по 21 мкл 48 пробирок по 21 мкл 48 пробирок по 21 мкл 2 пробирки по 800 мкл 2 пробирки по 200 мкл 2 пробирки по 200 мкл

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционных смесей GLA, MPC, EBM входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (4 зонда): зонд для специфического фрагмента одного возбудителя содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента второго возбудителя содержит флуорофор ROX, зонд для специфического фрагмента третьего возбудителя содержит флуорофор Cy5, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК

В состав реакционной смеси ОБМ входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентный зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления внутреннего контроля (общая бактериальная масса); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, качество выделения ДНК и количество анализируемого материала.

ПКО ФЕМОСКРИН представляет собой количественно охарактеризованную смесь калибраторов (плазмиды со встроенной вставку специфических фрагментов геномов микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом, и человека) в диапазоне $5 \times 10^4 - 2 \times 10^8$ ГЭ/мл. Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация соответствующего калибратора в образце ПКО ФЕМОСКРИН, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (Ct) для ПКО ФЕМОСКРИН на различных типах амплификаторов.

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора;
- вкладыш с данными ПКО.

Паспорт предоставляется по запросу пользователя.

Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru (ГОСТ 51088). На бумажном носителе инструкция предоставляется по запросу пользователя.

4.3. Принцип метода

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella spp.* путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

Возможность количественного определения ДНК *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella spp.* в режиме «реального времени» основывается на существовании зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (Ct).

В идеальном случае на каждом температурном цикле реакции количество нарабатываемой ДНК удваивается, т.е. количество продуктов реакции на цикле n равно начальному числу молекул, умноженному на 2^n :

$$N_n = N_0 2^n$$

где n – номер цикла реакции; N_0 – количество целевых молекул в начале реакции (на первом цикле); N_n – количество продуктов реакции на цикле n ; 2 – эффективность реакции (в оптимальных условиях эффективность ПЦР действительно близка к 2).

Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с положительным контрольным образцом с известной концентрацией ДНК-мишени.

Для сравнения графиков, полученных при проведении ПЦР «в реальном времени», используют один из двух основных подходов к анализу результатов: пороговый метод (определение значения порогового цикла реакции Ct, как точки пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии) или метод прямого сравнения графиков (определение значения некоторой точки Cp, crossing point, на графике накопления ДНК по форме кривой, например – метод максимума второй производной). Оба подхода предполагают нахождение некоторого значения на оси абсцисс (дробного значения цикла реакции), характеризующего данную кривую (найденное значение обычно обозначают как Ct в случае пороговых методов или Cp для методов, использующих анализ формы кривой). Полученные значения используют далее при сопоставлении результатов ПЦР для разных образцов. Суть порогового метода заключается в том, чтобы определить момент Ct (выраженный в циклах ПЦР), когда количество ДНК в реакционной пробирке (а, следовательно, и флуоресцентный сигнал)

достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины (задается пользователем или программным обеспечением). Сравнивая полученные значения C_t , можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше C_t , (т.е. чем быстрее количество ДНК в данном образце достигло пороговой величины), тем больше было в нем целевой ДНК в начальный момент времени. Зная пороговый цикл C_t для положительного контрольного образца (ПКО) с известной начальной концентрацией $C_{пко}$ можно вычислить относительную начальную концентрацию неизвестных образцов.

Формулы для расчета концентрации ДНК в анализируемом образце представлены в п. 11.3.

4.4. Метрологическая прослеживаемость значений концентрации калибраторов, входящих в состав ПКО ФЕМОСКРИН, проведена до уровня контрольных образцов предприятия (калибраторы первого порядка), изготовленных из геномной ДНК *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella spp.* Коммутабельность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации ДНК референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации при количественном исследовании ДНК, выделенной из соответствующих клинических образцов.

4.5. Ограничения метода

1) Метод ПЦР позволяет определять ДНК как в живых, так и в мертвых микроорганизмах. Поэтому ПЦР анализ клинических образцов следует проводить до начала лекарственной терапии; в случае приема антибиотиков или антимикотиков анализ проводится не раньше четырех - пяти недель после завершения курса лечения для определения эффективности терапии.

2) При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания ДНК возбудителя в клиническом образце.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов, т.е. способность выявлять в исследуемом образце только ДНК указанных в назначении микроорганизмов, а также отсутствие неспецифических реакций с ДНК других микроорганизмов и человека, доказана производителем при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Megasphaera type 1*, *Eggerthella spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus curtisii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, *HSV 1 tyna*, *HSV 2 tyna*, *CMV*, *HPV (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59)*, а также геномной ДНК человека.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как % истинно отрицательных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

5.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ можно обнаружить:

- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Atopobium vaginae* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе;

- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Prevotella* spp. в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2* в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Lactobacillus* spp. в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Mobiluncus curtisii* в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Megasphaera type 1* в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Gardnerella vaginalis* в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Candida albicans* в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Eggerthella* spp. в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе.

5.3. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Для образцов с концентрацией 2×10^5 геном-эквивалентов/мл для *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella* spp. коэффициент вариации составляет не более 10%.

5.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения – при детекции образцов с концентрациями 2×10^8 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella* spp. процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

5.5. Диапазон линейности

Диапазон линейности – это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями Ct и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Модуль коэффициента корреляции для образцов с концентрациями 2×10^8 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella* spp. составляет не менее 0,99.

Таким образом, диапазон линейности составляет от 2×10^8 до 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella* spp.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Atopobium vaginae*: 100 % (интервал 97,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Prevotella* spp.: 100 % (интервал 97,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*: 100 % (интервал 94,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Lactobacillus* spp.: 100 % (интервал 98,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Mobiluncus curtisii*: 100 % (интервал 94,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Megasphaera type 1*: 100 % (интервал 96,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*: 100 % (интервал 98,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Candida albicans*: 100 % (интервал 95,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Eggerthella spp.*: 100 % (интервал 96,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Atopobium vaginae*: 100 % (интервал 97,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Prevotella spp.*: 100 % (интервал 98,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Lactobacillus spp.*: 100 % (интервал 79,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Mobiluncus curtisii*: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Megasphaera type 1*: 100 % (интервал 98,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*: 100 % (интервал 92,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Candida albicans*: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Eggerthella spp.*: 100 % (интервал 98,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.3. Корреляция результатов

Показана высокая степень корреляции результатов измерения концентрации ДНК *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella spp.*, полученных с помощью набора реагентов «КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ», наборов реагентов сравнения «ДИПЛЕКС Gv+Ca», «Фемофлор® 16» и цифровой капельной ПЦР.

Разница между значениями концентрации ДНК *Atopobium vaginae* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 95,2 % случаев и превысила 0,5 lg в 4,8 % случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Разница между значениями концентрации ДНК *Prevotella spp.* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 95,5 % случаев и превысила 0,5 lg в 4,5 % случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Разница между значениями концентрации ДНК *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 94,0 % случаев и превысила 0,5 lg в 6,0 % случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Разница между значениями концентрации ДНК *Lactobacillus spp.* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 95,8 % случаев и превысила 0,5 lg в 4,2 % случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Разница между значениями концентрации ДНК *Mobiluncus curtisii* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 95,7 % случаев и превысила 0,5 lg в 4,3 % случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Разница между значениями концентрации ДНК *Megasphaera type 1* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 94,7 % случаев и превысила 0,5 lg в 5,3 % случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Разница между значениями концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 100,0 % случаев.

Разница между значениями концентрации ДНК *Candida albicans* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 100,0 % случаев.

Разница между значениями концентрации ДНК *Eggerthella spp.* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта не превышала 0,5 lg в 95,9 % случаев и превысила 0,5 lg в 4,1% случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Рассчитанный коэффициент корреляции Спирмена составил не менее 0,96 ($p < 0,001$), что свидетельствует о значительном сходстве (эквивалентности) сравниваемых тест-систем.

6.4. Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора **КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ** составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на заявленных термоциклерах, разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутривыпускная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения концентрации для одного и того же образца не превышает 10%.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» 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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III–IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.
- Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях.

Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора

- набор реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5 - 50 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 и 100 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

Для комплектации НЕРАСКАПАННЫЙ-РВ-60 дополнительно:

- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 200 и до 1000 мкл.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта).

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Взятие материала осуществляется одноразовым стерильным зондом.

За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

Особенности взятия материала из уретры.

- перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5 – 2 часов;
- непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором;
- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания;
- перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение;
- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0 – 1,5 см.

После взятия материала зонд опускается в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл, содержащую 0,5 – 1 мл стерильного физиологического раствора. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладагентами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала из цервикального канала.

- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5 – 1,5 см;
- при наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, и материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани;
- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

После взятия материала зонд опускается в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл, содержащую 0,5 – 1 мл стерильного физиологического раствора. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала из влагалища (мазок с заднего свода).

- материал должен быть взят до проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано;
- в случае избытка слизи или обильных выделений необходимо удалить их стерильным ватным тампоном;
- влагалищное отделяемое собирают стерильным одноразовым зондом из заднего нижнего свода или с патологически измененных участков слизистой.

После взятия материала зонд переносят в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл, содержащую 0,5 – 1 мл стерильного физиологического раствора, и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.3. Предварительная обработка клинического материала

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического материала.

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ реагенты, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот (ДНК) из клинического материала (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта) для ПЦР-диагностики. Производитель рекомендует использовать зарегистрированный в установленном порядке набор «НК-сорбент» (ООО НПФ «Литех», РЗН 2019/9331) совместно с набором КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ для полного цикла исследования образцов.

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Материалом для исследования набором реагентов КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб.

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ могут являться:

- использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала или наборов для пробоподготовки (выделение ДНК);
- использование для проведения ПЦР-исследования образцов ДНК, содержащих избыточное количество НК, в первую очередь, геномной ДНК человека в концентрации более 100 мкг/мл;
- эндогенные интерферирующие вещества, входящие в состав клинического материала (например, избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта), приводящие к получению недостаточно очищенного препарата ДНК в результате неэффективной экстракции наборами для пробоподготовки; такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию;
- экзогенные интерферирующие вещества (например, избыточное количество примесей в виде жиров в составе лекарственных препаратов местного действия - мазей, вагинальных свечей).

При использовании зарегистрированного в установленном порядке набора реагентов для выделения ДНК «НК-сорбент» (РУ № РЗН 2019/9331) интерференции не ожидается.

Производителем Набора реагентов **НК-сорбент** было показано сохранение эффективности выделения НК из клеток в случае присутствия в клинических образцах потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз.

Таблица 2.

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	кровь	10%
	слизь	20%
	гной	25%
	жиры	30%

Все это может приводить к ингибированию реакции амплификации, снижению чувствительности анализа и получению ложноотрицательных результатов.

Для контроля качества тестируемой ДНК и присутствия возможных ингибиторов в наборе реагентов **КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ** предусмотрено тестирование внутреннего контрольного образца (ВКО) с помощью специальных праймеров, входящих в состав реакционной смеси (см. п. 4.1 Инструкции). По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит о хорошем качестве тестируемого образца нуклеиновых кислот. Отсутствие сигнала ВКО после проведения ПЦР свидетельствует о ненадлежащем качестве образца для исследования и требует повторной пробоподготовки.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения НЕРАСКАПАННЫЙ-РВ-60.

10.1.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Для исследования одного образца ДНК требуется 4 пробирки (по числу реакционных смесей).

Маркировка пробирок недопустима! Пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.

10.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционными смесями и разбавителем тщательно перемешать.

10.1.3. Приготовить и промаркировать 4 одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл или 2,0 мл для приготовления амплификационных смесей.

10.1.4. Из компонентов набора приготовить **4 рабочие амплификационные смеси**:

1 - с Реакционной смесью ОБМ, **2** - с Реакционной смесью GLA, **3** - с Реакционной смесью MPC, **4** - с Реакционной смесью ЕВМ из расчета на 1 пробу (табл.3):

Таблица 3.

Компонент	Количество (мкл)
Разбавитель	21
Реакционная смесь	7
Taq-полимераза	0,3

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций. При приготовлении смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

10.1.5. Перемешать амплификационные смеси пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

10.1.6. Внести в соответствующие пробирки по 28 мкл полученных амплификационных смесей.

Перейти к пункту 10.3.

10.2. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения TwoStep-PB-96.

10.2.1. Достать набор из холодильника, подготовить необходимое количество стрипов с реакционными смесями, включая стрипы для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Маркировка пробирок недопустима!

Для исследования одного образца ДНК требуется половина стрипа (четыре пробирки А-Д или Е-Н). В каждой пробирке представлена реакционная смесь для определения соответствующих микроорганизмов.

Расположение реакционных смесей представлено на Рис. 1.

Рисунок 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Реакционная смесь ОБМ											
B	Реакционная смесь GLA											
C	Реакционная смесь MPC											
D	Реакционная смесь EBM											
E	Реакционная смесь ОБМ											
F	Реакционная смесь GLA											
G	Реакционная смесь MPC											
H	Реакционная смесь EBM											

10.2.2. Пробирку с Раствором Таq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

10.2.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Раствора Таq-полимеразы для приготовления амплификационной смеси.

Перейти к пункту 10.3.

10.3. Проведение амплификации, все варианты комплектаций.

10.3.1. В 4 пробирки с различными амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в 4 пробирки отрицательного контрольного образца (ОКО-ПЦР) – разбавитель;
- б) в 4 пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в 4 пробирки положительного контрольного образца – ПКО ФЕМОСКРИН.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

10.3.2. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.3.3. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлены программы амплификации для комплектаций TwoStep для различных видов амплификаторов):

«CFX 96» (BioRad)

+80 °C	2 мин*	40 циклов
+95 °C	1 мин 30 сек	
+95 °C	15 сек	
+60 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5)	
+72 °C	40 сек	

«ДТprime» (ДНК-Технология)

+80 °C	2 мин*	40 циклов
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	
+62 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5)	
+72 °C	20 сек	

* - для комплектации НЕРАСКАПАННЫЙ раздел программы +80 °C - 2 мин необязателен.

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов **КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ**, представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции			
		FAM	HEX	ROX	Cy5
«CFX96» (Bio-Rad)	<i>Analyze Data from Cycle 5 to 40</i>				
	<i>Baseline Setting – Apply Fluorescence Drift Correction</i>				
	Пороговая линия	60	50	50	30
	Конечный цикл (КЦ)				
	Реакционная смесь ОБМ	-	25	-	-
	Реакционная смесь GLA	36	30	35	35
	Реакционная смесь MPC	35	30	35	35
«ДТprime» (ДНК-технология)	Критерий положительного результата ПЦР	90%			
	Пороговая линия	100	20	20	20
	Конечный цикл (КЦ)				
	Реакционная смесь ОБМ	-	25	-	-
	Реакционная смесь GLA	36	30	35	35
	Реакционная смесь MPC	35	30	35	35
	Реакционная смесь EBM	35	30	36	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Отсутствие значения для образца (значение N/A или НД) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов (определение Ct) проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

11.2. Интерпретация результатов

Мишени, детектируемые по используемым каналам флуоресценции, представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Реакционная смесь	Канал флуоресценции и детектируемая мишень			
	FAM	ROX	Cy5	HEX
ОБМ	-	-	-	Общая бак. масса
GLA	<i>Atopobium vaginae</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	ДНК человека
MPC	<i>Prevotella spp.</i>	<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Candida albicans</i>	ДНК человека
EBM	<i>Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2</i>	<i>Megasphaera type 1</i>	<i>Eggerthella spp.</i>	ДНК человека

Количественный анализ содержания ДНК *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella spp.* в анализируемых образцах проводится только в случае получения правильных значений Ct для контрольных образцов (указаны в таблице 6).

Таблица 6.

Образец	Значения Ct для всех реакционных смесей			
	FAM	ROX	Cy5	HEX
ПКО ФЕМОСКРИН	Диапазон указан во вкладыше к набору			
ОКО-ПЦР	НЗ или > КЦ			

Примечание: НЗ – нет значения (значение N/A или НД), КЦ – конечный цикл.

В случае получения невалидных значений Ct для ПКО ФЕМОСКРИН требуется повтор постановки.

В случае получения невалидных значений Ct по каналу FAM, ROX, Cy5 для ОКО-ПЦР требуется повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.

В случае получения невалидных значений Ct по каналу HEX для ОКО-ПЦР повтор постановки не требуется.

Концентрация ДНК *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Eggerthella spp.*, общей бактериальной массы и ДНК человека* в образце вычисляется оператором самостоятельно по формуле:

$$C_{\text{образца}} = C_{\text{КО}} * 2^{(Ct_{\text{КО}} - Ct_{\text{образца}})}$$

*Концентрация ДНК человека в образце вычисляется для каждой реакционной смеси индивидуально.

$C_{\text{образца}}$ – концентрация ДНК микроорганизма (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{КО}}$ – концентрация соответствующего калибратора в ПКО ФЕМОСКРИН, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$Ct_{\text{образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$Ct_{\text{КО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции соответствующего калибратора с пороговой линией.

Концентрация ДНК микроорганизма может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. Используется значение концентрации ДНК человека, вычисленное для соответствующей реакционной смеси!

При этом концентрация ДНК микроорганизма из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется оператором самостоятельно по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК м/о}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000,$$

или в виде десятичного логарифма:

$$\lg \left(\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК м/о}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000 \right),$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК м/о}}$ - вычисленная концентрация ДНК микроорганизма в образце;

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$ - вычисленная концентрация ДНК человека в образце для соответствующей реакционной смеси.

Заключение по результатам выявления и количественной оценки содержания ДНК бактерий, ассоциированных с бактериальным вагинозом, в анализируемых образцах проводится согласно таблице 7. Точное указание концентрации ДНК *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtisii*, *Megasphaera type 1*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и *Eggerthella spp.* возможно только для рассчитанных значений, находящихся в диапазоне линейности набора.

Таблица 7.

Концентрация ДНК микроорганизма	Концентрация ДНК человека	Концентрация ОБМ	Заключение
Определена, от 2×10^3 до 2×10^8 ГЭ/мл	$> 5 \times 10^3$ ГЭ/мл	$> 5 \times 10^5$ ГЭ/мл	ДНК соответствующего микроорганизма ОБНАРУЖЕНА, возможно точное указание концентрации
Определена, менее 2×10^3 ГЭ/мл			ДНК соответствующего микроорганизма ОБНАРУЖЕНА, концентрация менее 2×10^3 ГЭ/мл
Определена, более 2×10^8 ГЭ/мл			ДНК соответствующего микроорганизма ОБНАРУЖЕНА, концентрация более 2×10^8 ГЭ/мл
Не определена	$> 5 \times 10^3$ ГЭ/мл	$> 5 \times 10^5$ ГЭ/мл	ОТСУТСТВИЕ ДНК соответствующего микроорганизма.
Любая	НЗ или $< 5 \times 10^3$ ГЭ/мл	Любая	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца с этапа пробоподготовки. В случае воспроизведения результата рекомендуется повторное взятие биологического материала.
Любая	Любая	НЗ или $< 5 \times 10^5$ ГЭ/мл	Ингибирование или недостаточное количество общей бактериальной массы. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца с этапа пробоподготовки. В случае воспроизведения результата рекомендуется повторное взятие биологического материала. Возможна низкая степень бактериальной обсемененности.

Примечание: ОБМ – общая бактериальная масса.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ** варианта исполнения **НЕРАСКАПАННЫЙ-РВ-60** должен храниться при температуре $-18...-20$ °C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 12 месяцев.

Наборы реагентов **КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ** вариантов исполнения **TwoStep-РВ-96**, 24 теста; **TwoStep-РВ-96**, 48 тестов должны храниться при температуре $+2...+8$ °C в течение всего срока годности. Срок годности наборов – 9 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Условия транспортирования набора должны соответствовать условиям хранения!

Для набора реагентов КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ варианта исполнения НЕРАСКАПАННЫЙ-РВ-60 допустима транспортировка при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 дней (не более).

Для наборов реагентов КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ вариантов исполнения TwoStep-РВ-96, 24 теста; TwoStep-РВ-96, 48 тестов допустима транспортировка при температуре $+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 дней (не более).

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА

Предприятие-изготовитель проводит приемочные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик (технические характеристики), внешний вид, комплектность, упаковку, маркировку, а также контроль качества сырья и компонентов.

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК выявляемых микроорганизмов.

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 1.2.3685-21.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение ДНК) и отходы после проведения амплификации подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора КОМПЛЕКС ФЕМОСКРИН-БВ, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 15 ЛИСТОВ

«05» 04 2029 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Г.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
15 шт.

Директор
Наумов А.Ю.

