



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПО «Литех»

А.Ю.Наумов

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для выявления и идентификации *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени
ДИПЛЕКС Gv+Ca для диагностики *in vitro*»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Gv+Ca** предназначен для одновременного выявления, идентификации и количественного определения ДНК *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, осадок мочи, секрет предстательной железы, отделяемое слизистой ротоглотки).

Функциональное назначение – Набор реагентов **ДИПЛЕКС Gv+Ca** предназначен для диагностики гарднереллеза и кандидоза и определения бактериальной нагрузки.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **ДИПЛЕКС Gv+Ca** может быть использован в клинической лабораторной диагностике гарднереллеза и кандидоза для выявления, идентификации и количественного определения возбудителей инфекций.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **ДИПЛЕКС Gv+Ca** выпускается в 5 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (НЕРАСКАПААННЫЙ, OneStep, TwoStep) (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	ДИПЛЕКС Gv+Ca-PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Taq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 50 мкл 2 пробирки по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл
2	ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. Разбавитель 3. ПКО ИППП	60 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл

3	ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. Разбавитель 3. ПКО ИППП	96 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл
4	ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. Раствор Таq-полимеразы 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	60 пробирок по 21 мкл 1 пробирка - 500 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл
5	ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. Раствор Таq-полимеразы 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	96 пробирок по 21 мкл 1 пробирка - 800 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл

Набор рассчитан на проведение анализа 60, 96 или 120 образцов, включая контрольные образцы, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной (амплификационной) смеси входят:

- раствор ДНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (3 зонда): зонд для специфического фрагмента одного возбудителя содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента второго возбудителя содержит флуорофор ROX, 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.

Амплификационная смесь комплектаций **OneStep** полностью готова к амплификации, содержит Таq-полимеразу;

Реакционная смесь комплектаций **TwoStep** требует внесения Таq-полимеразы, входящей в состав комплекта.

ПКО ИППП представляет собой количественно охарактеризованную смесь калибраторов (плазмиды со встроенной вставкой специфических фрагментов геномов возбудителей ИППП и человека) в диапазоне $5 \times 10^6 - 5 \times 10^4$ ГЭ/мл. Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация соответствующего калибратора в образце ПКО ИППП, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (Ct) для ПКО ИППП 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 **ДИПЛЕКС Gv+Ca** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans* 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 рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

Возможность количественного определения ДНК *Gardnerella vaginalis* и ДНК *Candida albicans* 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 Ct, можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше Ct, (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 Ct для положительного контрольного образца (ПКО) с известной начальной концентрацией $S_{пко}$ 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 ИППП, проведена до уровня контрольных образцов предприятия (калибраторы первого порядка), изготовленных из геномной ДНК *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*. **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: *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 muna*, *HSV 2 muna*, *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 ДИПЛЕКС Gv+Ca можно обнаружить:

- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Gardnerella vaginalis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Candida albicans* в прошедшей обработку (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 *Gardnerella vaginalis* и 2×10^5 геном-эквивалентов/мл для *Candida albicans* коэффициент вариации составляет не более 10%.

5.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения – при детекции образцов с концентрациями 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Gardnerella vaginalis* и 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Candida albicans* 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 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Gardnerella vaginalis* и 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Candida albicans* составляет не менее 0,99. Таким образом, диапазон линейности составляет от 2×10^7 до 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Gardnerella vaginalis* и от 2×10^7 до 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Candida albicans*.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*: 100 % (интервал 93,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Candida albicans*: 100 % (интервал 94,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*: 100 % (интервал 96,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Candida albicans*: 100 % (интервал 94,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.3. Показана тождественность диагностических характеристик набора **ДИПЛЕКС Gv+Ca** на разных видах клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, осадок мочи, отделяемое слизистой ротоглотки).

Таблица 2

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Микроорганизм	Результаты испытаний	
			Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	171	<i>Gardnerella vaginalis</i>	100% (95% ДИ: 96,0-100%)	100% (95% ДИ: 97,0-100%)
		<i>Candida albicans</i>	100% (95% ДИ: 95,6-100%)	100% (95% ДИ: 97,2-100%)
Секрет предстательной железы	156	<i>Gardnerella vaginalis</i>	100% (95% ДИ: 94,5-100%)	100% (95% ДИ: 97,1-100%)
		<i>Candida albicans</i>	100% (95% ДИ: 95,6-100%)	100% (95% ДИ: 96,7-100%)
Осадок мочи	128	<i>Gardnerella vaginalis</i>	100% (95% ДИ: 93,9-100%)	100% (95% ДИ: 96,3-100%)
		<i>Candida albicans</i>	100% (95% ДИ: 94,8-100%)	100% (95% ДИ: 95,9-100%)
Отделяемое ротоглотки	107	<i>Candida albicans</i>	100% (95% ДИ: 94,4-100%)	100% (95% ДИ: 94,7-100%)

6.4. Корреляция результатов

Показана высокая степень корреляции результатов измерения концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*, полученных с помощью набора реагентов «ДИПЛЕКС Gv+Ca» и наборов реагентов сравнения «МикозоСкрин», «Андрофлор® Скрин».

Разница между значениями концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, осадка мочи, секрета предстательной железы не превышала 0,5 lg в 90,0 % случаев и превысила 0,5 lg в 10,0% случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

Разница между значениями концентрации ДНК *Candida albicans* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, осадка мочи, секрета предстательной железы, отделяемого слизистой ротоглотки не превышала 0,5 lg в 91,5 % случаев и превысила 0,5 lg в 8,5% 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.

6.5. Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора **ДИПЛЕКС Gv+Ca** 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 санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных 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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных 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 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 **ДИПЛЕКС Gv+Ca** являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, осадок мочи, секрет предстательной железы, отделяемое слизистой ротоглотки - только для определения ДНК *C.albicans*).

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, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала;
- у женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение;
- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0 – 1,5 см, у мужчин – на 3 – 4 см и затем совершается несколько вращательных движений; у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. 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 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 пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. 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 с задней стенки глотки.

Одноразовый зонд вводят за мягкое небо в носоглотку и проводят по задней стенке глотки.

Особенности взятия секрета предстательной железы.

Перед взятием секрета простаты головка полового члена обрабатывается стерильным ватным тампоном, смоченным физиологически раствором. Секрет простаты берется после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. Затем из кавернозной части выдавливается простатический секрет, который собирается в стерильную емкость (сосуды с широким горлом, пробирки). После взятия секрета простаты он должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов. Транспортировка биологического материала должна производиться только в сумке-холодильнике.

Особенности взятия (сбора) мочи.

Мочу собирают утром натощак после сна или не ранее чем через 2-3 часа после последнего мочеиспускания.

При сборе мочи желательно использовать специальный контейнер для сбора мочи. Минимальный объем мочи необходимый для проведения анализа составляет 20 мл.

Если в лабораторию доставляется не вся собранная моча, то перед тем, как часть мочи сливается в посуду для транспортировки, ее необходимо тщательно взболтать.

Собранную мочу доставляют в лабораторию в течение 1-3 часов без дополнительного охлаждения. Длительное хранение мочи при комнатной температуре до исследования приводит к изменению не только ее физических свойств и к разрушению клеток, но и к размножению бактерий.

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, отделяемое слизистой ротоглотки, осадок мочи, секрет предстательной железы) для ПЦР-диагностики. Производитель рекомендует использовать зарегистрированный в установленном порядке набор «НК-сорбент» (ООО НПФ «Литех», РЗН 2019/9331) совместно с набором ДИПЛЕКС Gv+Ca для полного цикла исследования образцов.

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Материалом для исследования набором реагентов ДИПЛЕКС Gv+Ca являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб.

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов ДИПЛЕКС Gv+Ca 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, мочи, секрета предстательной железы), 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 3.

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	кровь	10%
	слизь	20%
	гной	25%
	жиры	30%
отделяемое носоглотки	кровь	10%
моча	гемоглобин	7,5 мг/л
секрет предстательной железы	кровь	10%

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 ДИПЛЕКС Gv+Ca предусмотрено тестирование внутреннего контрольного образца (ВКО) с помощью специальных праймеров, входящих в состав реакционной (амплификационной) 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 ДИПЛЕКС Gv+Ca-PB-120.

10.1.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

Маркировка пробирок на крышке возможна только для реал-тайм амплификатора Rotor-Gene, для всех остальных амплификаторов маркировка пробирок на крышке недопустима! В таком случае пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.

10.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью PB и разбавителем тщательно перемешать.

10.1.3. Из компонентов набора приготовить смесь из расчета на 1 образец (табл.4):

Таблица 4.

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

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

10.1.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным vortexированием в течение 10 секунд.

10.1.5. Внести в приготовленные пробирки по 28 мкл полученной амплификационной смеси.

Перейти к пункту 10.4.

10.2. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-96.

10.2.1. Достать набор из холодильника, подготовить и пронумеровать необходимое количество пробирок с реакционной смесью PB-TS, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

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.

Перейти к пункту 10.4.

10.3. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-96

Данная комплектация не требует предварительной подготовки реагентов и представляет собой полностью готовую амплификационную смесь PB-OS, содержащую Таq-полимеразу и расфасованную в пробирки для проведения реакции.

10.3.1. Достать из коробки и промаркировать необходимое число пробирок, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

10.3.2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек. на микроцентрифуге-вортексе.

10.4. Проведение амплификации, все варианты комплектаций.

10.4.1. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

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

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

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

10.4.3. 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)

«Rotor-Gene Q» (QIAGEN)

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

«iCycler IQ5» (BioRad)
«ДТ-96» (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)	
+72 °C	20 сек	

* - для комплектаций НЕРАСКАПАННЫЙ и OneStep 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 ДИПЛЕКС Gv+Ca представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Таблица 5.

Флуорофор	Возбудитель	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)
HEX	ДНК человека	20	35
FAM	<i>Gardnerella vaginalis</i>	200	35
ROX	<i>Candida albicans</i>	100	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. 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 проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

11.2. Интерпретация результатов

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 6.

11.3. Расчет концентрации ДНК в анализируемом образце

Внимание! Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения C_t для которых лежат в указанном диапазоне линейности.

Рассчитать концентрацию ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и – при необходимости – ДНК человека в образце по формуле:

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

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

$C_{\text{КО}}$ – концентрация соответствующего калибратора в ПКО ИППП, 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.

Таблица 6.

	Ct FAM	Ct ROX	Ct HEX	Результат
ПКО ИППП	22-28*	22-28*	22-28*	Реакция прошла
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< КЦ	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Исследуемый образец	< КЦ	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК двух возбудителя.
	< КЦ	НЗ или > КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i>
	НЗ или > КЦ	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК <i>Candida albicans</i>
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

* точный диапазон значений указан во вкладыше к набору реагентов

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Gardnerella vaginalis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК G.vag.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000,$$

концентрация ДНК *Candida albicans* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК C.alb.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000,$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК G.vag.}}$ - вычисленная концентрация ДНК *Gardnerella vaginalis* в образце;

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК C.alb.}}$ - вычисленная концентрация ДНК *Candida albicans* в образце;

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

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор ДИПЛЕКС Gv+Ca-PB-120 должен храниться при температуре -18...-20 °C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 12 месяцев.

Наборы **ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-60**, **ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-96** должны храниться при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности. Срок годности наборов – 9 месяцев.

Наборы **ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-60**, **ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-96** должны храниться при температуре -18...-20 °С в течение всего срока годности. Срок годности наборов – 4 месяца.

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 **ДИПЛЕКС Gv+Ca** 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 **ДИПЛЕКС Gv+Ca-PB-120** допустима транспортировка при температуре +2...+8 °С в течение 5 дней (не более).

Для наборов реагентов **ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-60**, **ДИПЛЕКС Gv+Ca-TwoStep-PB-96** допустима транспортировка при температуре +18...+25 °С в течение 3 дней (не более).

Для наборов реагентов **ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-60**, **ДИПЛЕКС Gv+Ca-OneStep-PB-96** допустима транспортировка при температуре +2...+8 °С в течение 1 суток (не более), либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

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 контроля 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 клиничко-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 **ДИПЛЕКС Gv+Ca**, 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 14 ЛИСТОВ



» 09 июля 2011 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Барнавичус П.К.

Прошито, проверено,
скреплено печатью.
Количество листов

шт.



Директор

Наумов А.Ю.