ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ
научно-производственная фирма

ИНСТРУКЦИЯ

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

ФЕМОФЛОР СКРИН

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ
ФСР 2010/08810

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ИНСТРУКЦИЯ

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

ФЕМОФЛОР СКРИН

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ФЕМОФЛОР СКРИН предназначен для выявления безусловно-патогенных микроорганизмов и оценки состояния биоценоза (количественных и качественных изменений состава микрофлоры и определения степени выраженности дисбаланса условно-патогенной и нормофлоры).

1.2. Набор реагентов ФЕМОФЛОР СКРИН предназначен для выявления ДНК условно- и безусловно-патогенных микроорганизмов (выявляемые микроорганизмы указаны в таблице 1), суммарной ДНК всех микроорганизмов (общей бактериальной массы), лактобактерий и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Набор реагентов ФЕМОФЛОР СКРИН включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бактериальная масса), смесь, специфичную для лактобактерий (*Lactobacillus* spp.) и смеси, специфичные для условно- и безусловно-патогенных микроорганизмов. Одна из пробирок содержит смесь для амплификации геномной ДНК человека (контроль взятия клинического материала (КВМ). КВМ используется

для исключения ошибок преаналитического этапа. В случае недостаточного для анализа количества забранного материала требуется повторное взятие клинического материала.

В наборе реагентов ФЕМОФЛОР СКРИН в пробирки со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов определяемых микроогранизмов, включены флуоресцентные метки Fam, Rox и Cy5. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации внутреннего контрольного образца и контроля взятия материала, входит флуоресцентный краситель Hex (таблица 1).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В пробирку №5 добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипованных пробирок (стрипов) в плашке. После прохождения амплификации программа сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предлагает программно изменить результат анализа, расположив данные из

каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке. В случае, если оператор дает согласие на эту операцию, скорректированные данные можно сохранить в новом файле.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие ДТ*лайт*[1] и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Таблица 1

Состав стрипов ФЕМОФЛОР СКРИН, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ про-бирки	Каналы детекции				Цвет буфера
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	Общая бактериальная масса	ВК	–	–	Голубой
2	Нормофлора – *Lactobacillus* spp.*	ВК	–	–	Бесцветный
3	*Gardnerella vaginalis/ Prevotella bivia/ Porphyromonas* spp.*	ВК	–	–	
4	*Ureaplasma* (*urealyticum* + *parvum*)	ВК	–	–	
5	*Candida* spp.*	КВМ	Маркер	–	
6	*Mycoplasma hominis*	ВК	*Mycoplasma genitalium*	–	
7	*Trichomonas vaginalis*	ВК	*Neisseria gonorrhoeae*	*Chlamydia trachomatis*	
8	Herpes simplex virus 2	ВК	Cytomegalovirus	Herpes simplex virus 1	

* – под spp. подразумевается широкая группа микроорганизмов, которая относится к данному роду, но может не соответствовать полностью роду в его систематическом понимании.

[1] – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

После прохождения амплификации по показателю индикаторного цикла программно рассчитывается количество общей бакмассы, лактобактерий и каждого из условно-патогенных микроорганизмов. Для безусловно-патогенных микроорганизмов проводится качественный анализ.

2.2. Состав набора

Набор реагентов для скринингового исследования микрофлоры урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 24 стрипа по 8 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq-полимеразы MAX – 4 пробирки (по 480 мкл);
- минеральное масло – 4 пробирки (по 960 мкл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

2.3. Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки) – от 2,5 ч.

2.4. Набор рассчитан на проведение 24 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

В случае исследования биоценозов урогенитального тракта у женщин определяется количество микроорганизмов в транспортной среде, пропорциональное общей обсемененности соответствующего биотопа.

3.1. Специфичность анализа

Список выявляемых набором микроорганизмов представлен в таблице 1.

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

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

3.2. Контроль взятия материала

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

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов ФЕМОФЛОР СКРИН требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий ДТ*лайт* или ДТ-96;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуры 50°С и 65°С;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;

- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб (производство ООО «НПО ДНК-Технология»);
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-НК-ПЛЮС или ПРОБА-ГС-ПЛЮС производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих:

- версия ПО не ниже 7.3.4.0.*[2];
- файл ФЕМОФЛОР_СКРИН.ini.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования у женщин используют соскобы эпителиальных клеток из влагалища (заднебоковые своды), уретры, цервикального канала.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала ПРОБА-НК-ПЛЮС или ПРОБА-ГС-ПЛЮС.

6.1. Взятие образцов урогенитальных соскобов

Взятие урогенитальных соскобов проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с транспортной средой для биопроб.

6.1.1. Общие требования

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

Исследование урогенитального биоценоза методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому

[2] – последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»:
http://www.dna-technology.ru/support/

взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса.

6.1.2. Материал для исследований

Решение о выборе места взятия материала для исследования (влагалище, уретра, цервикальный канал) для оценки состояния биоценоза принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

Женщины накануне обследования не должны проводить туалет половых органов и спринцевание.

Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал **возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови**. Неправильное взятие может привести к невозможности получения достоверного результата и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.

6.2. Особенности взятия материала из влагалища

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

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

6.3. Особенности взятия материала из уретры

- перед взятием биоматериала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5–2 часов;
- непосредственно перед взятием биоматериала необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, который можно смочить стерильным физиологическим раствором;
- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15–20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия биоматериала;

- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0–1,5 см, у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

6.4. Особенности взятия материала из цервикального канала

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

6.5. Порядок взятия материала в пробирку с транспортной средой

6.5.1. Откройте крышку пробирки.

6.5.2. С помощью одноразового зонда сделайте соскоб эпителиальных клеток из соответствующего биотопа (влагалище, уретра, цервикальный канал). Перенесите зонд с биоматериалом в пробирку с транспортной средой и тщательно прополощите его, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, отожмите избыток жидкости и выбросьте. При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

6.5.3. Плотно закройте крышку пробирки, промаркируйте пробирку.

6.6. Транспортировка и хранение исследуемого материала

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

Транспортировать и хранить образцы до начала исследования при 2–8°С.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из биологического материала

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

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

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки.

7.1.1. Выделение ДНК из урогенитальных соскобов с использованием комплекта ПРОБА-НК-ПЛЮС

Примечание. В лизирующем растворе допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65°С в течение 10 мин для растворения осадка.
На данном этапе использовать только наконечники с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

7.1.1.1. Пробирки, содержащие анализируемый материал, центрифугируйте в течение 10 мин при 13000 об/мин.

7.1.1.2. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести пробоподготовку отрицательного контрольного образца («К–»). Для этого в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внесите 100 мкл транспортной среды для биопроб и выполните п.п.7.1.1.3. – 7.1.1.18. настоящей инструкции.

7.1.1.3. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь её края.

7.1.1.4. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.1.5. Термостатируйте пробирки 15 мин при 65°С, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

7.1.1.6. Добавьте 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.1.7. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.

7.1.1.8. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.1.9. Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирку.

7.1.1.10. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.1.11. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.1.12. Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирку.

7.1.1.13. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.1.14. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.1.15. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65°С в течение 5 мин.

7.1.1.16. Добавьте к осадку 300 мкл буфера для растворения. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 сек.

7.1.1.17. Прогрейте пробирки при 65°С в течение 10 мин. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.1.18. Осадите капли центрифугированием пробирок при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Препарат ДНК готов для проведения ПЦР.

Препарат ДНК можно хранить при температуре минус 20°С в течение одного месяца или при температуре минус 70°С в течение одного года.

7.1.2. Выделение ДНК из урогенитальных соскобов с использованием комплекта ПРОБА-ГС-ПЛЮС

Примечание. В лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона в течение 15–20 мин при 50°С.
На данном этапе использовать только наконечники с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

7.1.2.1. Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте в течение 10 мин при 13000 об/мин.

7.1.2.2. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести пробоподготовку отрицательного контрольного образца («К–»). Для этого в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внесите 50 мкл транспортной среды для биопроб и выполнить п.п.7.1.2.3. – 7.1.2.21. настоящей инструкции.

7.1.2.3. Приготовьте смесь лизирующего раствора с сорбентом. Смешайте в отдельной пробирке:
- 150 х (N+1) мкл лизирующего раствора,
- 20 х (N+1) мкл предварительно ресуспендированного сорбента.

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К–».

7.1.2.4. Добавьте в каждую пробирку по 170 мкл полученной смеси.

7.1.2.5. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.2.6. Термостатируйте пробирки в течение 20 мин при 50°С.

7.1.2.7. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.2.8. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.2.9. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.2.10. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.2.11. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.2.12. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.2.13. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.2.14. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.2.15. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.2.16. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.2.17. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.2.18. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 50°С в течение 5 мин.

7.1.2.19. Добавьте к осадку 300 мкл элюирующего раствора и встряхните пробирки на вортексе в течение 5–10 сек.

7.1.2.20. Прогрейте пробирки при 50°С в течение 5 мин.

7.1.2.21. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2–8ºС. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить п.п. 7.1.2.20. – 7.1.2.21.

7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1. Промаркируйте по одному стрипу с запечатанной парафином смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца («К–») и положительного контрольного образца («К+»).

Примечание. Один стрип рассчитан на исследование одного образца.

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

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

7.2.4. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

Примечание. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего.

Образцы следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

7.2.5. Внесите в каждую пробирку стрипов для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

7.2.6. Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К–», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.). Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.7. Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.

7.2.8. Установите все стрипы в амплификатор детектирующий.

7.2.9. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первой постановке загрузите файл «ФЕМОФЛОР_СКРИН.ini» (п. 7.3.). При последующих постановках добавьте тест «ФЕМОФЛОР СКРИН» (п.7.4.), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (п. 7.4.6) и проведите ПЦР. При выборе теста «ФЕМОФЛОР СКРИН» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2.

Программа амплификации

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0	…	…	Хранение		Хранение

7.3. Загрузка теста «ФЕМОФЛОР СКРИН» для амплификаторов детектирующих **при первой постановке на данном компьютере**

Версия ПО не ниже 7.3.4.0.[3]

Примечание. Для иллюстраций использованы скриншоты версий 7.3.3.0., 7.3.4.0, 7.3.4.2.

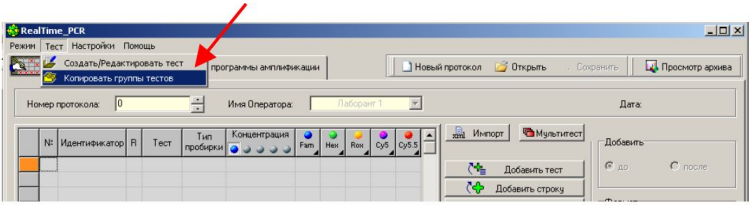
Тест «ФЕМОФЛОР СКРИН» для приборов ДТ*лайт* и ДТ-96 предоставляется производителем набора (файл ФЕМОФЛОР_СКРИН.ini). Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

7.3.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с набором ФЕМОФЛОР СКРИН, выберите режим «Работа с прибором»

Примечание. При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию, в которую по умолчанию будет сохраняться файл с результатами.

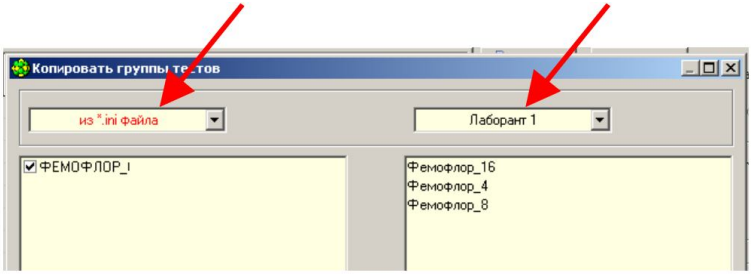
[3] – последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/support/

7.3.2. В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».

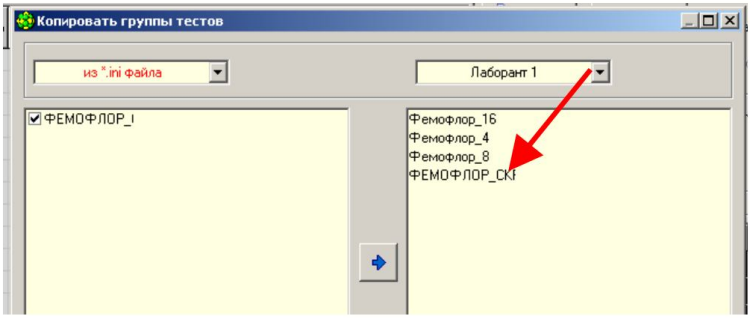


7.3.3. В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «ФЕМОФЛОР_СКРИН».

7.3.4. В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «ФЕМОФЛОР СКРИН».



7.3.5. Нажмите кнопку , после чего выбранный файл появится в правой половине окна.

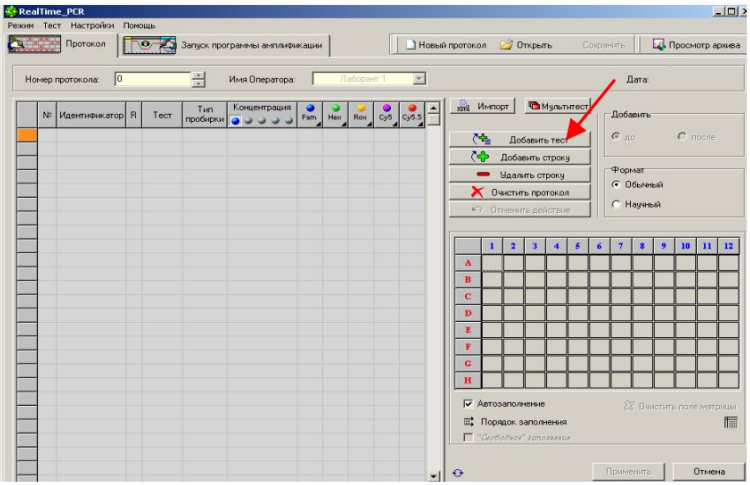


7.3.6. Теперь с тестом «ФЕМОФЛОР СКРИН» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

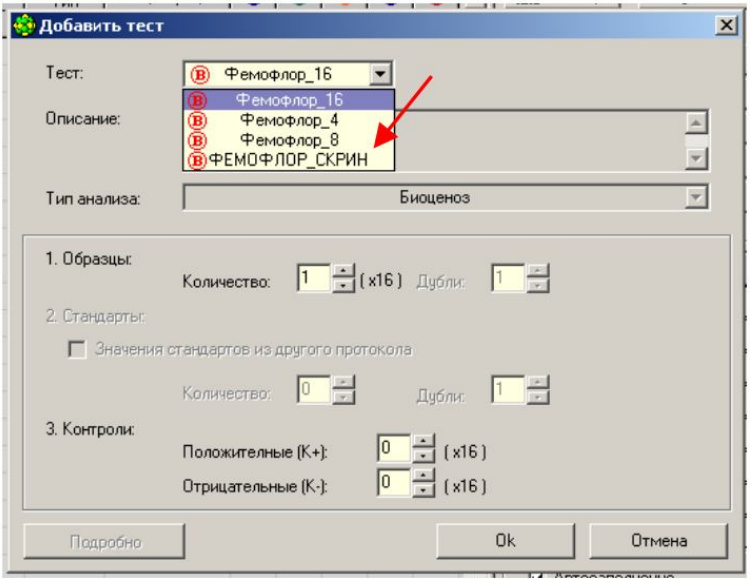
7.4. **Ежедневная работа** с тестом «ФЕМОФЛОР СКРИН»

7.4.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. п.7.3.4), выберите режим«Работа с прибором».

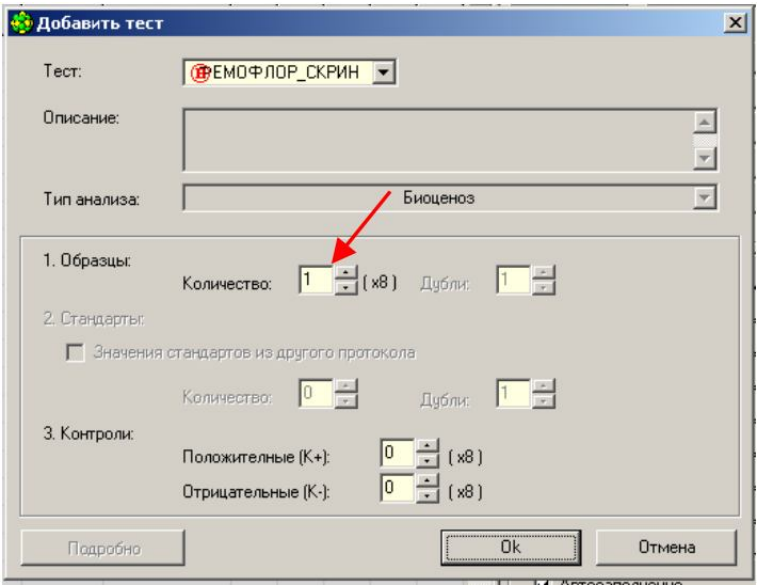
7.4.2. Нажмите кнопку «Добавить тест».



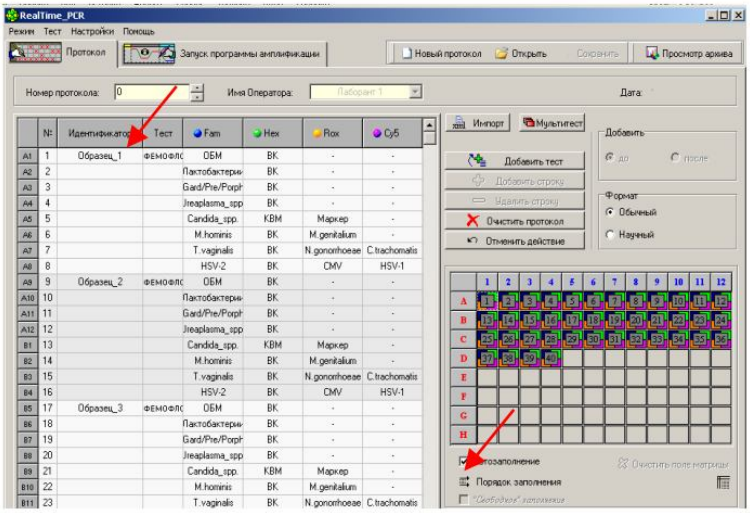
7.4.3. Выберите из списка тест «ФЕМОФЛОР СКРИН».



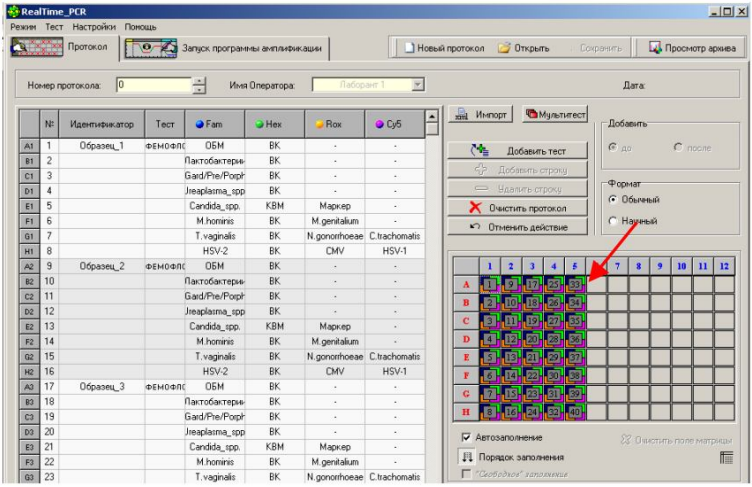
7.4.4. Укажите количество исследуемых образцов, положительных и отрицательных контролей, нажмите кнопку «Ок».



7.4.5. Укажите идентификатор пробирок. Нажмите кнопку «Порядок заполнения» — .

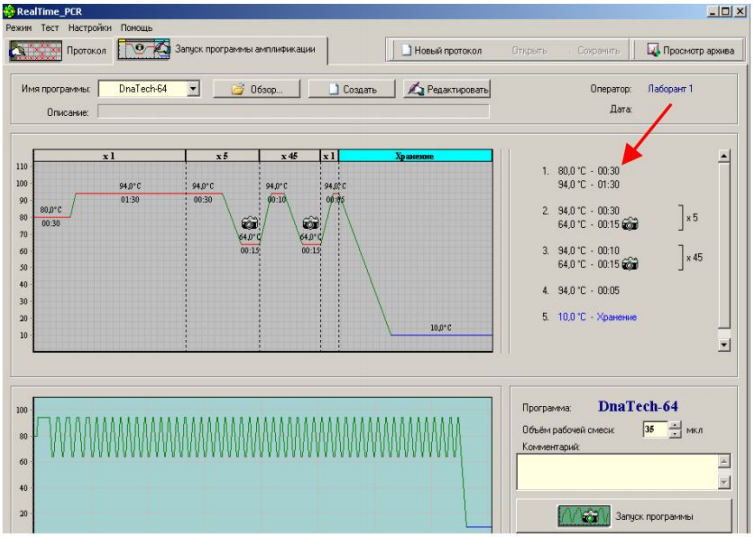


7.4.6. Отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой.



7.4.7. Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.4.8. В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «DnaTech-64».



7.4.9. Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

7.4.10. Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см.п. 7.3.1.).

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляется амплификатором детектирующим в соответствии с инструкцией к прибору.

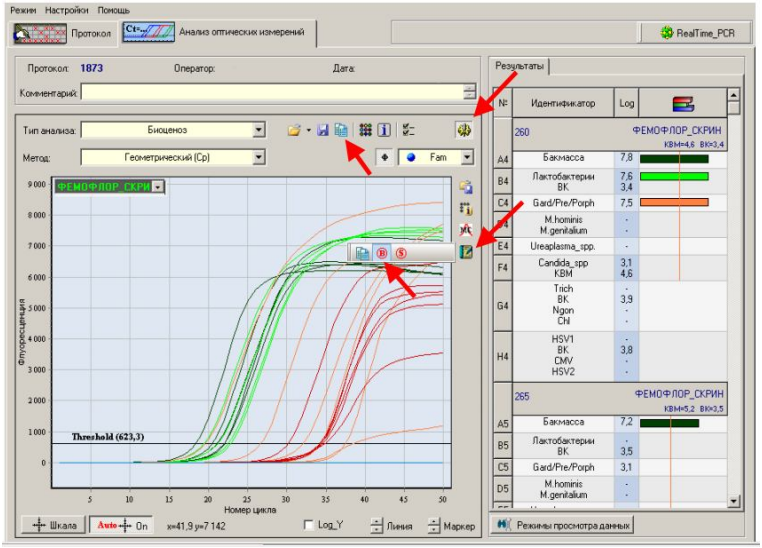
После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п.4.6. «Руководство по эксплуатации. Часть 1. Работа с прибором»).

Анализ проводится программным обеспечением автоматически. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (Ср), результат по каждому исследованию (для безусловно-патогенных микроорганизмов - качественный анализ, для остальных - количество и диаграмма, по которым можно судить о соотношении нормофлоры и условно-патогенных микроорганизмов в каждом из анализируемых образцов).

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчёта необходимо нажать кнопку «Отчет по результатам анализа» .

Для создания специализированного отчёта следует открыть инструментальную панель (кнопка), выбрать «Отчёты» (кнопка), выбрать «Специализированный отчёт по Биоценозам» (кнопка).



9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2. После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предлагает программно изменить результат анализа, расположив данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке. В случае если оператор дает согласие на эту операцию, скорректированные данные можно сохранить в новом файле.

9.3. При анализе результатов необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ) и внутреннего контроля (ВК):

9.3.1. Значение КВМ меньше 4,0 следует интерпретировать как недостаточное количество материала (см. п. 3.2.). В этом случае требуется повторное взятие клинического материала.

9.3.2. Если значение ВК меньше 3,5, то результаты теста считаются недостоверными из-за ингибирования реакции. В этом случае требуется либо повторная постановка

амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение ДНК, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.4. При наличии в исследуемом образце ДНК микроорганизмов, выявляемых набором ФЕМОФЛОР СКРИН, в строке с названием этого микроорганизма для безусловно-патогенных микроорганизмов указан результат качественного анализа («+» или «-»), для остальных – количество микроорганизма (десятичный логарифм концентрации) и гистограмма, в графическом виде отображающая количество данного микроорганизма.

9.5. В положительных контрольных образцах все показатели количества микроорганизмов (в виде десятичных логарифмов концентрации) должны быть больше 4,0. При получении значений ниже 4,0, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.6. В отрицательных контрольных образцах все показатели количества микроорганизмов (в виде десятичных логарифмов концентрации) не должны превышать значений, указанных в таблице 3. При получении значений, превышающих значения, указанные в таблице 3, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 3

Количество микроорганизмов, определяемых в отрицательном контрольном образце

№ проб	Название смеси	Выявляемая позиция	Канал детекции	Lg («К–»)
1	Общая бактериальная масса	Общая бактериальная масса	Fam	не более 3,5
2	Нормофлора – *Lactobacillus* spp.	Нормофлора – *Lactobacillus* spp.	Fam	не более 2,5
3	*Gardnerella vaginalis/ Prevotella bivia/ Porphyromonas* spp.	*Gard/Pre/Porph*	Fam	не более 2,5
4	*Ureaplasma* (*urealyticum* + *parvum*)	*Ureaplasma*_spp.	Fam	–
5	*Candida* spp./ контроль взятия материала/ROX	*Candida*_spp.	Fam	не более 3,0
		КВМ	Hex	–
6	*Mycoplasma hominis/ Mycoplasma genitalium*	*M.hominis*	Fam	–
		M.genitalium	Rox	–
7	*Trichomonas vaginalis/ Neisseria gonorrhoeae/ Chlamydia trachomatis*	*T.vaginalis*	Fam	–
		N.gonorrhoeae	Rox	–
		C.trachomatis	Cy5	–
8	Herpes simplex virus 1/ Cytomegalovirus/ Herpes symplex virus 2	HSV-2	Fam	–
		CMV	Rox	–
		HSV-1	Cy5	–

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

10.2. Все компоненты набора реагентов следует хранить при температуре 2–8°С в течение всего срока годности набора.

10.3. Транспортировку набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре 2–8°С в течение всего срока годности набора.

10.4. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.6. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировка, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для скринингового исследования микрофлоры урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР СКРИН), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11, ООО «ДНК-Технология»
Тел./факс + 7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru
Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:
http://www.dna-technology.ru/support/

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru