

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Альфалаб»



 М.А.Суворова

10 июня 2026 г

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для исследования микробиоты толстого кишечника

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

«КОЛОНОФЛОР ОПТИМА»

Версия № 4

10.06.2026

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	3
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
2.1.	ФОРМА ВЫПУСКА НАБОРА	4
2.2.	СОСТАВ НАБОРА	4
2.3.	ПРИНЦИП МЕТОДА	5
2.4.	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
3.	ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ	9
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	10
5.	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	12
6.	ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	13
7.	ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МАТЕРИАЛА	14
8.	ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	14
8.1.	ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	14
8.2.	ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ФЕКАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ	15
8.3.	ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	15
8.4.	ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА	17
8.5.	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	19
8.6.	ЭКСПОРТ ДАННЫХ В ПРОГРАММУ «Optima»	19
8.7.	ОБРАБОТКА ДАННЫХ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ПРОГРАММЕ «OPTIMA»	22
8.8.	РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ	24
9.	УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	25
10.	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	25
11.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	25
12.	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	25
13.	ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И СПОСОБЫ РЕШЕНИЯ	26
14.	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	28
15.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	28
16.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	28

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- 1.1. Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для исследования микробиоты толстого кишечника методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА», далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2. Набор реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА» предназначен для анализа фекальных образцов человека методом ПЦР в реальном времени, количественного выявления ДНК облигатных и патогенных микроорганизмов с целью мониторинга состояния микробиоценоза толстого кишечника и выявления дисбиотических нарушений у лиц 14 лет и старше, без ограничений по популяционным признакам.
- 1.3. Реагенты для экстракции ДНК не входят в состав набора реагентов. Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», РУ № ФСР 2009/05220 от 05 марта 2019 г.).
- 1.4. Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика. Только для исследований *in vitro*.
- 1.5. Функциональное назначение - диагностика *in vitro*.
- 1.6. Показанием к проведению исследования с применением набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА» является необходимость оценки количественного состава микробиоценоза толстого кишечника в диагностических целях.
- 1.7. Набор реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА» выявляет 33 показателя, включая 7 групп микроорганизмов (идентификация на уровне рода), 23 вида бактерий (идентификация на уровне вида), определение общего бактериального числа, и наличие генов патогенности, определяющих энтероинвазивные свойства *E.coli*. Перечень выявляемых аналитов содержится в Таблице 2. Перечень определяемых микроорганизмов составлен на основе научных данных о качественном и количественном составе кишечной флоры в норме, а также изменениях её состава при функциональных нарушениях деятельности желудочно-кишечного тракта и воспалительных заболеваниях кишечника.
- 1.8. Диагностическая значимость исследования заключается в выявлении изменений микробного состава кишечника, свидетельствующих о нарушении иммунного и метаболического равновесия.
- 1.9. Результаты исследования, полученные с применением набора реагентов, могут быть использованы в комплексной диагностике с учётом данных анамнеза и

общеклинического обследования пациента, но не должны применяться в качестве единственной основы для постановки диагноза и принятия решения о необходимости терапии.

- 1.10. Целевая группа пациентов – лица мужского и женского пола от 14 лет и старше, без ограничения по популяционным признакам.
- 1.11. Потенциальный пользователь – сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку и имеющие достаточную квалификацию для проведения исследований в области диагностики *in vitro* методом ПЦР в режиме реального времени.
- 1.12. Класс потенциального риска применения – 2б (пункты 9.3.4. и 9.3.5, Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).
- 1.13. Применение изделия противопоказано для детей от 0 до 3-х лет. Программное обеспечение «Optima», предназначенное для количественной обработки результатов теста, не учитывает особенностей состава микробиоты у детей этой возрастной группы. При обработке результатов (сравнении с референтными данными) высок риск ложной интерпретации и диагностических ошибок.
- 1.14. Не рекомендуется применение изделия для детей и подростков от 3-х до 14 лет. Клиническая валидация диагностической эффективности и точности программных алгоритмов для данной возрастной категории не проводилась.
- 1.15. Относительным противопоказанием является нарушение подготовки к анализу – взятие образцов для исследования ранее, чем через 14 дней после окончания курса антибактериальной терапии.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1. ФОРМА ВЫПУСКА НАБОРА

Набор имеет одну форму выпуска. Набор рассчитан на проведение 24 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Для анализа одного образца используется 2 стрипа по 8 пробирок, содержащих 16 амплификационных смесей разной специфичности. Порядок расположения пробирок со смесями каждой специфичности строго регламентирован, представлен на Рисунке 1.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

В комплект поставки медицинского изделия «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА» входят:

- Набор реагентов (состав согласно Таблице 1);
- Программное обеспечение «Optima», версия 3.0 или выше (1 файл);

- Инструкция по применению в печатном (1 шт.) и электронном вариантах (доступ к электронному варианту инструкции посредством размещаемого на лицевой этикетке QR кода со ссылкой на облачное хранилище);
- Паспорт набора (1 шт.).

Таблица 1. Состав набора реагентов.

Компонент набора	Объем компонента, мкл	Количество стрипов/пробирок
Комплект стрипов № 1	20	24 стрипа по 8 пробирок
Комплект стрипов № 2	20	24 стрипа по 8 пробирок
Минеральное масло	2000	5 пробирок
Раствор Taq-полимеразы	1500	3 пробирки
Положительный контрольный образец (ПКО-1)	200	1 пробирка
Положительный контрольный образец (ПКО-2)	200	1 пробирка
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	400	1 пробирка
Крышки для стрипов	-	48 штук

Данные о специфичности смесей для амплификации представлены в Таблице 2.

2.3. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.3.1. Исследование выполняется *in vitro* с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и предполагает обнаружение и количественную оценку фрагментов ДНК.

Для проведения реакции и выявления ДНК микроорганизмов используются специфические олигонуклеотидные праймеры и меченые олигонуклеотидные зонды Taqman. Гибридизация специфических олигонуклеотидов с комплементарными участками генома детектируемых микроорганизмов в присутствии фермента Taq-полимеразы приводит к образованию продуктов амплификации и циклическому экспоненциальному росту их количества. Наличие в реакционной смеси специфических флуоресцентно-меченых зондов Taqman и 5'-3' экзонуклеазная активность Taq-полимеразы позволяют осуществлять детекцию образующихся продуктов амплификации в режиме реального времени. Появление детектируемого сигнала связано с отщеплением флуоресцентной метки и разобщением в пространстве источника флуоресценции и гасителя, при этом интенсивность сигнала прямо пропорциональна количеству продуктов амплификации и нарастает с каждым последующим циклом. Включение в состав зондов флуоресцентных меток с разными спектральными характеристиками (FAM, ROX, Cy5) позволяет реализовать принцип мультиплексной ПЦР для детекции нескольких микроорганизмов в одной пробирке.

Для количественной обработки результатов теста, полученных с применением набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА», используется Программное обеспечение «Optima», поставляемое совместно с набором. ПО «Optima» позволяет преобразовать полученные для каждого выявляемого показателя значения порогового цикла C_t в количество копий на миллилитр, и с учётом копийности гена, используемого для амплификации, рассчитать значение в КОЕ/мл, которое является окончательным результатом теста.

Полученные данные отражают состояние микробиоценоза кишечника, указывают на наличие (отсутствие) дисбиотических сдвигов, а также на наличие условно-патогенной флоры. Результаты исследования могут быть использованы в комплексной диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта.

2.3.2. Анализ состава микробной флоры фекальных образцов предполагает проведение следующих этапов:

- 1) Первый этап – выделение ДНК из образцов биологического материала (с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК, рекомендованного в п. 1.3. настоящей Инструкции);
- 2) Второй этап – амплификация специфических участков ДНК методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в режиме реального времени с использованием набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА»;
- 3) Третий этап – количественная обработка данных с использованием программного обеспечения «Optima».

2.3.3. Набор «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА» предназначен для использования на амплификаторах детектирующих для постановки ПЦР в режиме реального времени с регистрацией флуоресцентного сигнала по каналам: FAM, ROX, Cy5. Набор совместим с приборами:

1. Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010, РУ № ФСР 2011/10228 от 03 марта 2011 г., производитель ООО «НПО ДНК-Технология»;
2. Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010, РУ № ФСР 2011/10229 от 24 марта 2025 г., производитель ООО «НПО ДНК-Технология»;
3. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями (CFX96 Touch), РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016, производитель «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США.

Таблица 2. Перечень выявляемых микроорганизмов, визуальное описание стрипов и каналы детекции результатов амплификации.

Стрип 1				
№ пробирки	Канал детекции	Показатель	Цвет смеси	Цвет покрытия
1	FAM	<i>Общее бактериальное число</i>	голубой	бесцветный
2	FAM	<i>Lactobacillus spp.</i>	бесцветный	бесцветный
	ROX	<i>Klebsiella spp</i>		
3	FAM	<i>Ruminococcus gnavus</i>	бесцветный	бесцветный
	ROX	<i>Bifidobacterium longum</i>		
4	FAM	<i>Bacteroides spp</i>	бесцветный	бесцветный
	ROX	<i>Escherichia coli</i>		
5	FAM	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	бесцветный	бесцветный
	ROX	<i>Eubacterium rectale</i>		
6	FAM	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	бесцветный	бесцветный
	ROX	<i>Methanosphaera stadmanae</i>		
7	FAM	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	бесцветный	бесцветный
	ROX	<i>Akkermansia muciniphila</i>		
8	FAM	<i>Bifidobacterium spp.</i>	бесцветный	бесцветный
	ROX	<i>Roseburia inulinivorans</i>		

Таблица 2(продолжение). Перечень выявляемых микроорганизмов, визуальное описание стрипов и каналы детекции результатов амплификации.

Стрип 2				
№ пробирки	Канал детекции	Показатель	Цвет смеси	Цвет покрытия
1	FAM	<i>Escherichia coli enteropathogenic</i>	голубой	голубой
	ROX	<i>Citrobacter spp.</i>		
2	FAM	<i>Prevotella spp</i>	бесцветный	голубой
	ROX	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>		
3	FAM	<i>Candida albicans</i>	бесцветный	голубой
	ROX	<i>Staphylococcus aureus</i>		
4	FAM	<i>Clostridioides difficile</i>	бесцветный	голубой
	ROX	<i>Clostridium perfringens</i>		
	Cy-5	<i>Helicobacter pylori</i>		
5	FAM	<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	бесцветный	голубой
	ROX	<i>Blautia spp.</i>		
6	FAM	<i>Enterococcus faecium</i>	бесцветный	голубой
	ROX	<i>Enterococcus faecalis</i>		
7	FAM	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	бесцветный	голубой
	ROX	<i>Parvimonas micra</i>		
8	FAM	<i>Alistipes finegoldii</i>	бесцветный	голубой
	ROX	<i>Dysosmobacter welbionis</i>		

2.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

2.4.1. Аналитическая чувствительность в отношении отдельных микроорганизмов (групп микроорганизмов) представлена в Таблице 3.

Таблица 3. Данные о аналитической чувствительности и специфичности смесей для амплификации.

Стрип 1				
№	Показатель	Канал детекции	Аналитическая чувствительность	
			копий/мл	КОЕ/мл
1	Общая бактериальная масса	FAM	10 ⁴	10 ⁴
2	<i>Lactobacillus spp.</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
3	<i>Klebsiella spp</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
4	<i>Ruminococcus gnavus</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
5	<i>Bifidobacterium longum</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
6	<i>Bacteroides spp</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
7	<i>Escherichia coli</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
8	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
9	<i>Eubacterium rectale</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
10	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
11	<i>Methanosphaera stadmanae</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
12	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
13	<i>Akkermansia muciniphila</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
14	<i>Bifidobacterium spp.</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
15	<i>Roseburia inulinivorans</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴

Таблица 3 (продолжение). Данные о аналитической чувствительности и специфичности смесей для амплификации.

Стрип 2				
№	Показатель	Канал детекции	Аналитическая чувствительность	
			копий/мл	КОЕ/мл
1	<i>Escherichia coli enteropathogenic</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
2	<i>Citrobacter spp.</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
3	<i>Prevotella spp</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
4	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
5	<i>Candida albicans</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
7	<i>Clostridioides difficile</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
8	<i>Clostridium perfringens</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
9	<i>Helicobacter pylori</i>	Cy-5	10 ⁴	10 ⁴
10	<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
11	<i>Blautia spp.</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
12	<i>Enterococcus faecium</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
13	<i>Enterococcus faecalis</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
14	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
15	<i>Parvimonas micra</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴
16	<i>Alistipes finegoldii</i>	FAM	10 ⁴	10 ⁴
17	<i>Dysosmobacter welbionis</i>	ROX	10 ⁴	10 ⁴

Важно: набор соответствует указанным значениям аналитической чувствительности при условии, что количественные значения для ПЦР-смесей всех специфичностей, рассчитанные для положительных контрольных образцов (ПКО-1 и ПКО-2) с применением ПО «Optima», соответствуют указанным в Паспорте набора.

2.4.2. Аналитическая специфичность анализа при постановке теста с применением набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА» подтверждена:

- отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналам FAM, ROX и Cy-5 в отрицательных контрольных образцах.

2.4.3. Функциональные характеристики

2.4.3.1. Повторяемость и воспроизводимость результатов, получаемых с использованием набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА», оценивалась при анализе клинических образцов, предусмотренных назначением набора. Для каждого определяемого показателя проводили расчёт концентрации с использованием ПО «Optima», полученные значения логарифмировали и вычисляли коэффициенты вариации (CV). При оценке повторяемости и воспроизводимости продемонстрирована незначительная степень рассеивания; значения CV не превышали 7,9%.

2.4.3.2. Правильность измерений и количественного расчёта контролировали по данным пяти измерений для каждого показателя, определяя величину рассеивания и среднюю абсолютную ошибку (MAE) для двоичных логарифмов рассчитанных концентраций. Полученные для MAE значения соответствовали критерию приемлемости и не превышали 0.5.

2.4.3.3. Линейность оценивали, используя серийные десятикратные разведения положительного по каждому определяемому аналиту образца, для каждого измерения определяли значение концентрации в КОЕ/мл с применением ПО «Optima», логарифмировали полученные значения (рассчитывали Log_{10}) и определяли значение коэффициента аппроксимации R^2 . Для всех определяемых аналитов значения R^2 находились в пределах допустимых ($R^2 \geq 0.98$).

3. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Наличие потенциально интерферирующих веществ в анализируемых образцах ДНК может приводить к снижению эффективности ПЦР, вплоть до полного ингибирования реакции, что становится причиной некорректных результатов. Источником ингибиторов могут быть компоненты транспортных сред, реагенты, используемые для выделения ДНК, лекарственные препараты (экзогенные ингибиторы). Ингибиторы также могут присутствовать в исходных образцах биологического материала

(эндогенные ингибиторы). К эндогенным ингибиторам относятся гемоглобин, билирубин, холестерин, триглицериды жирных кислот, муцин; экзогенными ингибиторами являются изопропанол, метилацетат.

Важно: при строгом соблюдении правил взятия биоматериала, пробоподготовки и экстракции ДНК количество интерферирующих веществ в пробе минимизируется и не оказывает негативного влияния на результаты анализа. Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Предельно допустимая концентрация интерферирующих веществ в пробе не приводящая к искажению результата.

Исследуемый биоматериал	Тип интерферента	Интерферент	Исследованная концентрация вещества в образце биоматериала
Фекальный образец	Эндогенный	Билирубин	670 мкмоль/л
		Гемоглобин	0,35 мг/мл
		Триглицериды	35 ммоль/л
		Муцин	20%
		Холестерин	13 ммоль/л
Препарат ДНК, выделенный из фекального образца	Экзогенный	Изопропанол	10%
		Метилацетат	10%

Примечание: Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивали путём добавления потенциальных интерферентов эндогенного происхождения (билирубин, гемоглобин, триглицериды, муцин, холестерин) в образцы биологического материала объёмом 100 мкл на этапе экстракции ДНК. Интерференты экзогенного происхождения (изопропиловый спирт и метилацетат – вещества, присутствующие в препарате ДНК в случае неполного удаления промывочных растворов в ходе процедуры экстракции) добавляли непосредственно в препараты ДНК в указанных концентрациях. Подготовленные таким образом образцы использовали для постановки ПЦР с использованием набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА».

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Класс потенциального риска применения набора реагентов в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий – 2б (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).

- 4.2.** При разработке и производстве набора реагентов соблюдены требования ГОСТ ISO 14971-2021 по минимизации рисков, связанных с применением медицинского изделия.
- 4.3.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, набор не содержит в своём составе материалов человеческого или животного происхождения.
- 4.4.** Исследуемые с использованием набора образцы ДНК должны рассматриваться как потенциально инфекционно-опасные.
- 4.5.** Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей требования МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».
- 4.6.** Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Для разных этапов проведения анализа используются отдельные помещения (зоны). Работу следует начинать в зоне выделения, продолжать в зоне амплификации и детекции. Не разрешается возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- 4.7.** К работе с набором допускается специально обученный персонал, прошедший подготовку на специализированных курсах по работе с микроорганизмами II–IV групп патогенности и имеющий дополнительное специальное образование по молекулярно-биологическим методам диагностики.
- 4.8.** Разрешается применение набора только строго по назначению, согласно данной инструкции и в пределах обозначенного срока годности.
- 4.9.** Не допускается использование набора при повреждении внутренней упаковки или несоответствии внешнего вида реагентов описанию.
- 4.10.** Не допускается использование набора, если не были соблюдены условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- 4.11.** Не допускается смешивание реагентов разных серий.
- 4.12.** В процессе работы обязательно использование индивидуальных средств защиты: одноразовых перчаток, лабораторных халатов. При работе с набором следует избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При

попадании компонентов набора на кожу рекомендуется немедленно промыть место контакта проточной водой.

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из фекальных образцов

Необходимое оборудование и материалы:

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 3000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Термит (ДНК-технология, Россия), поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5-10; 20-200; 100-1000 мкл;
- емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- контейнер с крышкой для дезинфицирующего раствора;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09;
- Весы лабораторные II класса точности по ГОСТ Р 53228-2008;
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл;
- Стерильный изотонический раствор натрия хлорида (или ФСБ).

2-й этап – проведение ПЦР-амплификации и детекция продуктов амплификации

Необходимое оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10; 5-50; 20-200 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5-10; 20-200 мкл;

- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09;
- емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- контейнер с крышкой для дезинфицирующего раствора;
- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией флуоресценции по каналам FAM, ROX и Cy-5 в режиме «реального времени»;
- программное обеспечение для анализа результатов совместимое с моделью используемого амплификатора.

6. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

6.1. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала должно проводиться в строгом соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 2021 г.

6.2. Забор материала рекомендовано производить не ранее чем через 2 суток после окончания приема энтеросорбентов, про- и пребиотиков, ректальных суппозитория; не ранее чем через 14 суток после приема антибиотиков.

6.3. Материалом для исследования являются фекальные образцы. Пробы фекалий массой (объемом) 1-3 г (1-3 мл) забирают в стерильный пластиковый контейнер. Исследование мазков неинформативно из-за низкого содержания микроорганизмов.

6.4. Контейнер с материалом доставляется в лабораторию и хранится до начала исследования при следующей температуре:

Образцы нативных фекалий

- при температуре 18–25 °С — в течение 6 ч;
- при температуре 2–8 °С — в течение 3 сут;
- при температуре –16°С — в течение 7 сут;

Суспензия фекалий с глицерином:

- при температуре от –24 до –16 °С — в течение 7 сут;
- при температуре не выше –68 °С — длительно.

Процедура приготовления фекальной суспензии с глицерином описана в п. 7.1.3 данной инструкции.

6.5. Допускается транспортировка предварительно обработанных образцов суспензии фекалий (см. п. 7.1.2 данной инструкции) при температуре 2–8 °С в течение 24 ч. Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

7.1. Перед проведением исследования пробы биоматериала должны пройти этап предварительной обработки (п. 8.1. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК).

7.2. Для адекватной количественной оценки состава микробиоты кишечника для выделения ДНК берётся **строго** определенное количество биоматериала – 0,1 г, то есть перед процедурой экстракции необходимо взвешивание биоматериала.

7.3. Экстракцию ДНК проводят из бактериальной фракции фекалий (см. п. 7.1.2, 7.1.4 и 7.1.5 данной инструкции), что обеспечивает адекватность оценки состояния микробиоценоза кишечника.

7.4. Контролем адекватного взятия материала и качественно проведенной процедуры экстракции ДНК являются показатели общей бактериальной массы не ниже 10^5 ГЭ/образец.

7.5. При избыточном количестве материала, использованного для выделения ДНК, возможно ингибирование ПЦР-реакции и искажение результатов анализа.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

8.1.1. Экстракцию ДНК необходимо проводить из жидкого материала, поэтому для выделения ДНК используют фекалии водянистой консистенции или фекальную суспензию.

8.1.2. Для приготовления фекальной суспензии в соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) вносят 0,8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Далее в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии.

8.1.3. При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к полученной суспензии фекалий добавляют

глицерин в конечной концентрации 15-20%. Смесь тщательно гомогенизируют на вортексе и после 30-40 минутной экспозиции с глицерином замораживают.

8.1.4. Непосредственно перед процедурой выделения ДНК готовят бактериальную фракцию фекалий. Для этого пробирки с фекальной суспензией центрифугируют при 10 000 – 13 000 об/мин в течение 30 секунд. Для выделения ДНК используют верхнюю фракцию (супернатант). Фекальную суспензию, хранившуюся в морозильной камере, перед центрифугированием необходимо выдержать при комнатной температуре до полного размораживания.

8.1.5. При использовании водянистых фекалий суспензию не готовят. В стерильные пробирки отбирают 0,1 мл фекалий и центрифугируют при 10 000 – 13 000 об/мин в течение 30 секунд. Для выделения ДНК используют верхнюю фракцию (супернатант).

Для обеспечения эффективного разрушения клеточных стенок как грамм-отрицательных, так и грамм-положительных бактерий рекомендуется проведение дополнительной механической обработки фекальной суспензии с помощью стеклянных бус.

8.2. Экстракция ДНК из фекальных образцов

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

8.2.1. Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплекты реагентов, зарегистрированные в РЗН РФ и предназначенные для применения в клинической лабораторной диагностике при анализе фекальных образцов («ДНК-сорб-В», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РУ № ФСР 2009/05220 от 05.03.2019).

8.2.2. После процедуры экстракции образцы ДНК хранят при температуре от 2 до 8 °С не более одной недели. Более длительное хранение (до 6 месяцев) возможно при температуре не выше минус 18 °С, при этом необходимо избегать повторного замораживания/размораживания образцов ДНК.

8.3. Постановка реакции амплификации

Общий объём реакционной смеси – 35 мкл, включая объём пробы ДНК – 5 мкл.

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с аэрозольным барьером!

8.3.1. В штатив поставить необходимое количество стрипов со смесью для амплификации из расчета: два стрипа с разной маркировкой (стрип-1, стрип-2) для

каждого из анализируемых образцов, два стрипа с разной маркировкой (стрип-1, стрип-2) для анализа ПКО и два стрипа с разной маркировкой (стрип-1, стрип-2) для анализа ОКО.

Порядок расположения пробирок в стрипе строго регламентирован (См. Таблицу 2). Для правильной ориентации стрипов при постановке их в прибор, смесь для амплификации в первой пробирке стрипа окрашена.

8.3.2. В каждую пробирку, не повреждая слой воска, внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы;

8.3.3. В каждую пробирку внести по капле минерального масла;

8.3.4. Закрыть крышки стрипов;

8.3.5. Для предотвращения контаминации рекомендуется перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься образец, и закрывать перед внесением следующего образца.

8.3.6. Внести в каждую пробирку стрипа, предназначенного для **отрицательного контрольного образца** по 5 мкл ОКО;

8.3.7. Внести во все пробирки стрипов, предназначенных для **исследуемых образцов** по 5 мкл соответствующей анализируемой пробы ДНК;

8.3.8. Внести в каждую пробирку стрипа-1, предназначенного для **положительного контрольного образца** по 5 мкл ПКО-1;

8.3.9. Внести в каждую пробирку стрипа-2, предназначенного для **положительного контрольного образца** по 5 мкл ПКО-2;

8.3.10. Установить все стрипы в блок детектирующего амплификатора, как показано на Рисунке 1, в соответствии с вместимостью детектирующего блока используемого прибора. Стрипы нужно расположить следующим образом: стрип-1 для первого анализируемого образца, стрип-2 для первого анализируемого образца, стрип-1 последующего образца и т.д.;

ВНИМАНИЕ! Для **корректной количественной обработки данных** следует располагать стрипы в соответствии со схемой на рисунке 1, без отступов и пропусков!

Рисунок 1. Расположение стрипов в блоке детектирующего амплификатора.

а) Детектирующий блок вместимостью 48 пробирок (горизонтальное расположение стрипов)

	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	Стрип-1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	
C									
D									
E									
F									

б) Детектирующий блок вместимостью 96 пробирок (вертикальное расположение стрипов)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1										
B	2	2										
C	3	3										
D	4	4										
E	5	5										
F	6	6										
G	7	7										
H	8	8										

Стрип-1

Стрип-2

8.4. Проведение теста

8.4.1. Удобный запуск на ДТ-лайт и ДТ-прайм

При проведении исследования с использованием амплификаторов ДТ-лайт и ДТ-прайм («ДНК-технология») рекомендуется использовать ini-файл, содержащий протокол исследования и параметры амплификации. Для этого необходимо скачать файл «KF_optima.ini» (с помощью QR кода на лицевой этикетке или по ссылке: <https://alphalabs.ru/doc-kf-optima/>) и загрузить его, соблюдая следующую последовательность действий:

- Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором»;
- В меню «Тест» окна программы «RealTime_PCR» выберите команду «Копировать группы тестов» и пункт «из *.ini-файла»;

- В открывшемся окне проводника выберите нужный ini-файл, нажмите «Открыть»; файл переместится в левое окно копирования тестов;
- В строке над правой частью окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, который будет использовать данный тест;
- В списке слева отметьте галочкой необходимый для импорта тест и нажмите на появившуюся в центре синюю стрелку. Файл с параметрами теста переместится в правое окно и будет выведено сообщение «Копирование тестов успешно завершено». Файл «KF_optima.ini» загружается однократно, повторная загрузка перед каждой постановкой не требуется. При последующих запусках прибора протокол амплификации будет доступен в меню «Добавить тест», при выборе теста «KF-Optima» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в Таблице 5.

8.4.2. Удобный запуск на BioRad

При проведении исследования с использованием амплификатора C1000 с оптическим модулем CFX96 (BioRad) рекомендуется использовать подготовленные файлы. Для этого необходимо скачать файлы «Kolonoflor.prc1» и «KF_Optima_plate.pltd» (с помощью QR кода на лицевой этикетке или по ссылке: <https://alphalabs.ru/doc-kf-optima/>) и использовать данные файлы при создании анализа, «Kolonoflor.prc1» - содержит протокол амплификации (Protocol), «KF_Optima_plate.pltd» - содержит информацию о расположении, наименовании и канале считывания для всех ячеек (Plate).

Таблица 5. Параметры программы амплификации

Режим амплификации для приборов CFX96 (BioRad)		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	15 мин	1
94°C	5 сек	5
58°C	6 сек	
72°C	10 сек	
94°C	5 сек	40
58°C	6 сек *	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		
Режим амплификации для прибора ДТлайт, ДТ-прайм (ДНК технология)		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	15 мин	1
94°C	10 сек	45
58°C	10 сек *	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		

* Регистрация флуоресценции по каналам FAM, ROX и Cy-5

Важно: обратите внимание, что при настройке режима амплификации на приборах Bio Rad, циклические этапы реализованы с помощью команды GO TO, что подразумевает прохождение одного цикла и возврат к указанному шагу, обозначенное пользователем количество раз.

1	94.0	C for 15:00
2	94.0	C for 0:05
3	58.0	C for 0:06
4	72.0	C for 0:10
5	GOTO 2	4 more times
6	94.0	C for 0:05
7	58.0	C for 0:06
+ Plate Read		
8	72.0	C for 0:10
9	GOTO 6	39 more times
10	10.0	C Forever
END		

8.5. Регистрация результатов амплификации

8.5.1. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием детектирующего амплификатора.

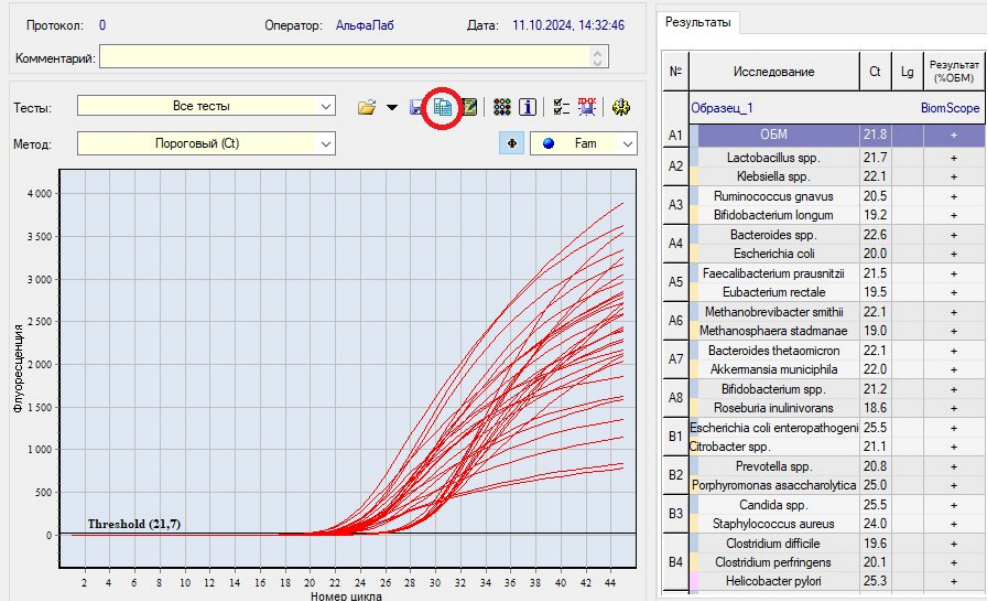
8.5.2. После окончания реакции детектирующий амплификатор автоматически формирует отчет об исследовании, включающий данные о величине индикаторного цикла для каждой ячейки амплификатора, в которой прибором зарегистрировано нарастание флюоресценции.

8.5.3. Данные, содержащиеся в отчете об исследовании, подвергаются обработке с использованием ПО «Optima», входящего в состав набора.

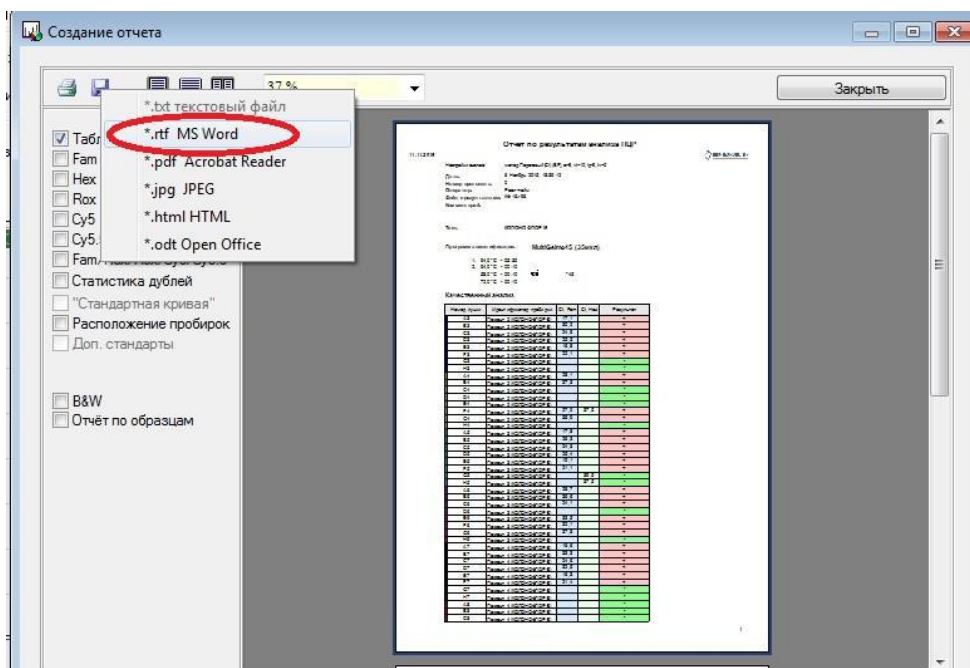
8.6. Экспорт данных в программу «Optima»

8.6.1 При работе на приборах ДТлайт, ДТпрайм

8.6.1.1. По окончании программы амплификации нажать кнопку «Отчет»:

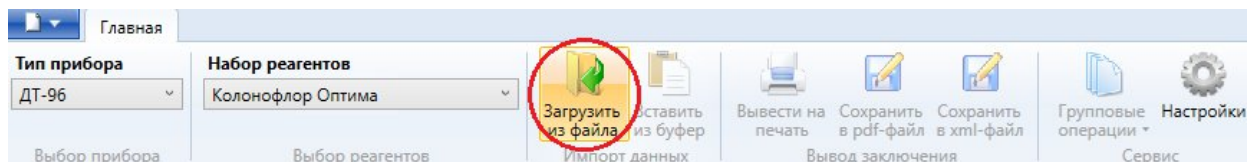


и сохранить отчет в формате *.rtf:



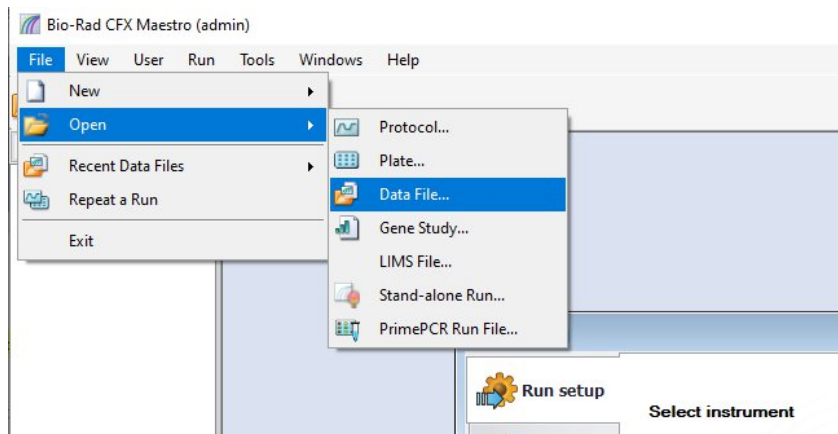
8.6.1.2. Запустить ПО «Optima» для количественной обработки результатов.

8.6.1.3. Далее в верхнем меню файла нужно выбрать тип используемого прибора (детектирующего амплификатора). Формат используемого набора реагентов – Колонофлор-Оптиме будет определён по умолчанию. С помощью кнопки «Загрузить из файла», загрузить в него полученные данные – отчет в формате *.rtf.

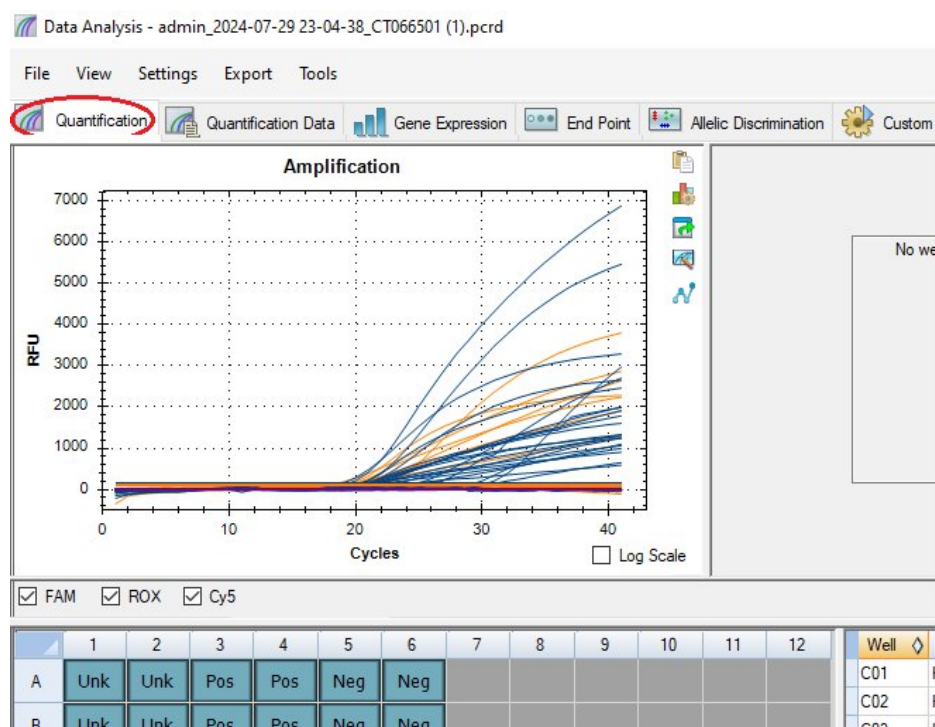


8.6.2. При работе на приборах Bio-Rad

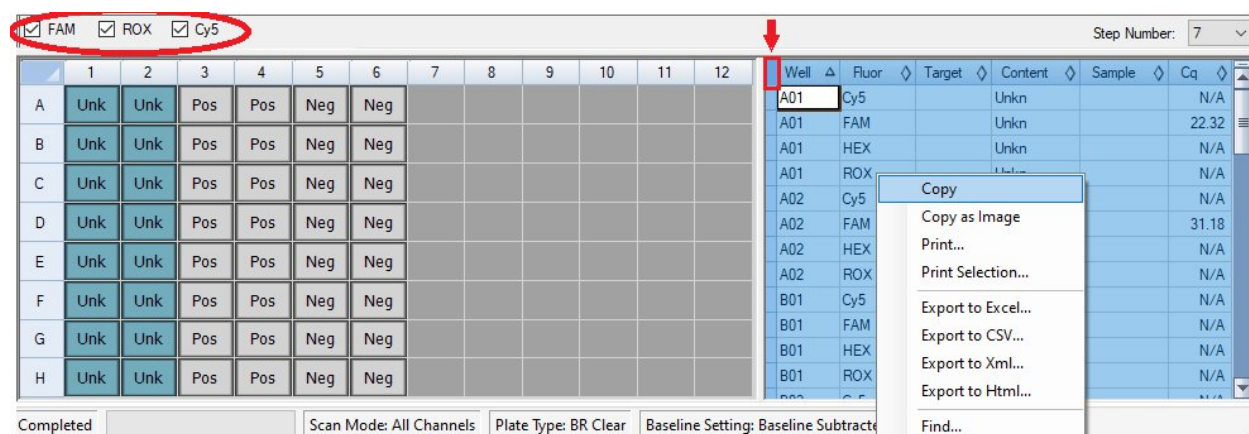
8.6.2.1. По окончании программы амплификации, открыть файл с результатами анализа (формат *.pcrd):



8.6.2.2. В открывшемся окне, во вкладке «Quantification»:

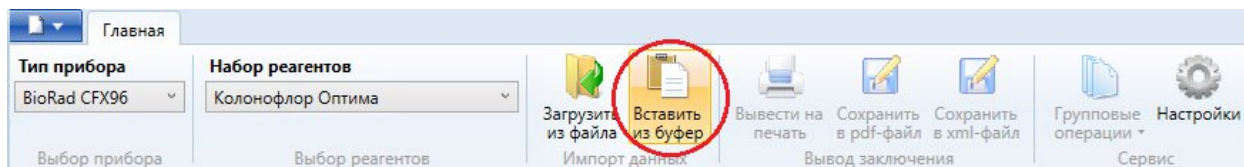


В левом нижнем углу (области выбора отображения ячеек), необходимо выделить ячейки, содержащие стрипы, которые предполагается обработать. Также необходимо отметить галочками все каналы детектирования (FAM, ROX, Cy-5). После этого выделить **всю** область с результатами (в правом нижнем углу), для этого левой кнопкой мыши нажать на помеченную на рисунке ниже область. Далее выделенный фрагмент сохранить в буфер обмена (нажать правую кнопку мыши и в выпавшем меню выбрать «Сору»):



8.6.2.3. Запустить ПО «Optima» для количественной обработки результатов.

8.6.2.4. Далее в верхнем меню файла нужно выбрать тип используемого прибора (детектирующего амплификатора) и нажать на кнопку «Вставить из буфер» (формат используемого набора реагентов – КФ-ОПТИМА определён по умолчанию).



8.7. Обработка данных и интерпретация результатов в программе «Optima».

Для количественной обработки результатов теста, полученных с применением набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА», используется ПО, поставляемое совместно с набором. Для более подробного ознакомления с ПО ознакомьтесь с Руководством пользователя.

После окончания амплификации показатели порогового (индикаторного) цикла C_t при использовании файла для обработки преобразуются в количество каждого из выявленных микроорганизмов, аналогичным образом рассчитывается общее бактериальное число. Полученные данные отражают состояние микробиоценоза кишечника, указывают на наличие (отсутствие) дисбиотических сдвигов, а также на наличие условно-патогенной флоры.

8.7.1. Завершив экспорт данных в ПО «Optima» (см. п. 8.6.1 и 8.6.2 Инструкции), необходимо в соответствующие поля вписать данные о пациенте: в поле «Пациент» вносится фамилия или идентификационный номер пациента, заполнение поля «Возраст» не является обязательным и не влияет на результат обработки данных.

Тип прибора ДТ-96 Выбор прибора		Набор реагентов Колонофлор Оптима Выбор реагентов		Загрузить из файла Импорт данных		Вставить из буфера Импорт данных		Вывести на печать Вывод заключения		Сохранить в pdf-файл Вывод заключения		Сохранить в xml-файл Вывод заключения		Групповые операции Сервис		Настройки													
Стрип 1 Стрип 2		Пациент: <i>Иванов Иван Иванович</i>																											
		Возраст: <i>50</i>				Биоматериал: <i>Фекалии</i>				Номер: <i>123456789</i>																			
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>N</th> <th>Показатель</th> <th>C_t</th> <th>Результат</th> <th>!</th> <th>Референсные значения</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Общая бактериальная масса</td> <td>22.32</td> <td>$4 \cdot 10^4$</td> <td></td> <td>$10^4 - 10^{13}$</td> </tr> </tbody> </table>																N	Показатель	C_t	Результат	!	Референсные значения	1	Общая бактериальная масса	22.32	$4 \cdot 10^4$		$10^4 - 10^{13}$
N	Показатель	C_t	Результат	!	Референсные значения																								
1	Общая бактериальная масса	22.32	$4 \cdot 10^4$		$10^4 - 10^{13}$																								

8.7.2. В правом нижнем углу нажать на кнопку «Подтвердить результаты и перейти к заключению»:

8.7.3. Для каждого образца автоматически формируется заключение, отражающее

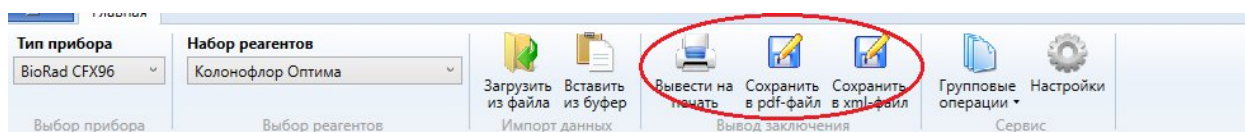
следующие показатели:

качественный и количественный состав облигатных представителей микрофлоры толстого кишечника (бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки);

качественный и количественный состав условно-патогенной флоры (если выявлено);

наличие дисбиотических сдвигов (количественное соотношение отдельных видов (групп) микроорганизмов);

Заключение формируется на основе сравнения показателей, полученных при анализе клинического образца, с референтными интервалами для каждой группы микроорганизмов. Сформированное заключение можно сохранить в формате pdf или xml, а также вывести на печать с помощью соответствующих кнопок.



8.7.4. Для каждой постановочной серии необходимо провести сравнение количественных показателей для ПКО-1, ПКО-2 и ОКО с заданными (указанными в паспорте к серии набора), сделав соответствующий вывод о достоверности результатов теста.

8.7.5. При получении значений для положительных контрольных образцов ПКО-1 и ПКО-2, превышающих или отличающихся от указанных в Паспорте набора в сторону занижения на один порядок и более, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. Все образцы должны быть проанализированы повторно.

8.7.6. При наличии флуоресцентного сигнала при прохождении амплификации с ОКО и получении значений порогового цикла C_t ниже указанных в паспорте к серии набора как предельно допустимые для ОКО, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. Необходимо проведение комплекса мероприятий для устранения контаминации; после чего все образцы данной серии должны быть проанализированы повторно.

8.8. Референтные интервалы

Таблица 6. Референтные интервалы анализируемых показателей.

№	Показатель	Референтный интервал
1	Общая бактериальная масса	10^{11} - 10^{13}
2	<i>Lactobacillus spp</i>	10^7 - 10^8
3	<i>Klebsiella spp</i>	не более 10^4
4	<i>Ruminococcus gnavus</i>	не более 10^{10}
5	<i>Bifidobacterium longum</i>	10^9 - 10^{10}
6	<i>Bacteroides spp</i>	10^9 - 10^{12}
7	<i>Escherichia coli</i>	10^6 - 10^8
8	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	10^8 - 10^{11}
9	<i>Eubacterium rectale</i>	10^8 - 10^{11}
10	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	не более 10^{10}
11	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	не более 10^6
12	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	допустимо любое количество
13	<i>Akkermansia muciniphila</i>	не более 10^{11}
14	<i>Bifidobacterium spp</i>	10^9 - 10^{10}
15	<i>Roseburia inulinivorans</i>	10^8 - 10^{10}
16	<i>Escherichia coli enteropathogenic</i>	не более 10^4
17	<i>Citrobacter spp</i>	не более 10^4
18	<i>Prevotella spp</i>	не более 10^{11}
19	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	не более 10^8
20	<i>Candida albicans</i>	не более 10^4
21	<i>Staphylococcus aureus</i>	не более 10^4
22	<i>Clostridioides difficile</i>	не обнаружено
23	<i>Clostridium perfringens</i>	не обнаружено
24	<i>Helicobacter pylori</i>	не обнаружено
25	<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	не более 10^4
26	<i>Blautia spp</i>	10^8 - 10^{11}
27	<i>Enterococcus faecium</i>	не более 10^8
28	<i>Enterococcus faecalis</i>	не более 10^8
29	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	не обнаружено
30	<i>Parvimonas micra</i>	не обнаружено
31	<i>Alistipes finegoldii</i>	10^8 - 10^{11}
32	<i>Dysosmobacter welbionis</i>	10^8 - 10^{10}
33	Отношение <i>Bacteroides spp</i> и <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (Bspp/Fprau)	0,01-100

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев с даты изготовления.

9.2. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

9.3. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9.4. Транспортирование набора реагентов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от + 2 до 8 °С, длительность транспортировки не должна превышать 5 суток.

9.5. Условия хранения отдельных компонентов набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА» указаны на упаковке. Стрипы со смесями для амплификации необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре от + 2 до + 8 °С. Раствор Taq-полимеразы необходимо хранить при температуре от + 2 до + 8 °С.

9.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

10.1. Наборы, потерявшие свои потребительские качества в результате ненадлежащего хранения, а также наборы и их компоненты с истекшим сроком годности подлежат утилизации в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

10.2. Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

11.1. Гарантийный срок годности Набора реагентов устанавливается со дня приёмки изделия отделом технического контроля предприятия-изготовителя.

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

12. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

12.1. Производитель: ООО «Альфалаб», Россия. Адрес производителя: 197022, Санкт Петербург, ул. Академика Павлова, д. 14А, литер А, помещ. 23-Н.

12.2. По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Альфалаб» по адресу: 197022, Санкт Петербург, ул. Академика Павлова, д. 14А, литер А, помещ. 23-Н

или по электронной почте: info@alphalabs.ru (Служба клиентской поддержки), support@alphalabs.ru (Служба технической поддержки).

13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И СПОСОБЫ РЕШЕНИЯ

13.1. Невалидный результат ПЦР

Причинами получения невалидного результата ПЦР могут быть ошибки при экстракции нуклеиновых кислот или наличие ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор и исследование биологического материала.

13.1.1. Для отрицательного контроля ПЦР (ОКО) определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация образца продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации в лаборатории и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

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

13.1.3. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM для показателя «Общее бактериальное число», что свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

13.1.4. Для положительного контрольного образца (ПКО) значение порогового цикла (Ct) выше допустимого (указанного в паспорте к серии набора), что свидетельствует о деградации компонентов реакционной смеси или изменении свойств контрольного образца. Возможные причины: истечение срока годности набора, нарушение

температурного режима при хранении или транспортировке, неправильные параметры протокола амплификации.

13.2. Некорректная количественная обработка данных

Для количественной обработки результатов теста, полученных с применением набора реагентов «КОЛОНОФЛОР ОПТИМА», используется ПО «Optima». После загрузки данных ПО проверяет формат загруженного файла (массива данных), проводит расчеты, выводит сообщения о найденных отклонениях и проверяет достоверность полученных значений. В ходе работы программы могут возникнуть следующие ошибки/предупреждения:

13.2.1. Ошибка формата при импорте данных в формате *.rtf (ДНК-Технология). Текст ошибки: В источнике ...\\наименование отчета.rtf не обнаружены данные требуемого формата! Загрузка отменена. Причина: выбран неверный файл, отчет в формате *.rtf сгенерирован неверно. Возможное решение: повторно сгенерировать отчет, согласно п. 7.5.2.1. данной инструкции.

13.2.2. Ошибка формата при импорте данных из буфера обмена (Bio-rad). Текст ошибки: Ошибка в обработке данных буфера обмена. Причина буфер обмена на момент импорта содержал данные неверного формата. Проверить данные в буфере обмена можно выбрав команду «вставить» в таблице Microsoft Excel, скопированные данные должны соответствовать результатам ПЦР и содержать, как минимум, номер ячейки, обозначение флюорофора и значение порогового цикла. Возможное решение: повторно скопировать данные постановки в буфер обмена согласно пп. 8.6.2.1 – 8.6.2.3 данной инструкции.

13.2.3. Предупреждение об ошибке постановки. Текст: Возможна ошибка постановки! Значения показателей: ... превышают значение общего бактериального числа. Причина: неверная интерпретация импортированных данных. Возможное решение: убедитесь в правильности отображения значений Ct в пользовательском интерфейсе ПО и в файле результатов ПЦР. Если значения Ct в отчёте о постановке определены корректно, результат анализа образца невалидный, необходимо повторно провести исследование данного образца начиная с этапа пробоподготовки. Если значения не совпадают, это может свидетельствовать об искажении импортируемых данных; для исключения искажения данных следует придерживаться рекомендуемого расположения стрипов согласно п.7.3.10, а также выбирать каналы флюоресценции FAM, ROX и Cy-5. Также предусмотрена корректировка значений Ct напрямую в

пользовательском интерфейсе ПО: для этого левой кнопкой мыши необходимо выбрать данное значение и ввести корректное.

14. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор «Колонофлор Оптима» предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

15. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ПЦР- полимеразная цепная реакция

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПКО- положительный контрольный образец

ОКО- отрицательный контрольный образец

ПО – программное обеспечение

16. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ



Только для диагностики *in vitro*



Температурный диапазон



Номер серии



Дата изготовления



Срок годности



Хрупкое, обращаться с осторожностью



Не допускать воздействия влаги