

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Альфалаб»



М.А.Суворова

2019г

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия
“Набор реагентов для исследования
микробиоты толстого кишечника
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с флуоресцентной детекцией в реальном времени
«КОЛОНОФЛОР»”

Варианты комплектации:

Форма 1 «КОЛОНОФЛОР- 8»

Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)»

Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)»

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ	3
2.	ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ	3
3.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	3
3.1.	ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	3
3.2.	СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
3.3.	ПРИНЦИП МЕТОДА	4
3.4.	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	10
5.	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	10
6.	ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
7.	ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МАТЕРИАЛА АНАЛИЗИРУЕМОГО	12
8.	ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	13
8.1.	ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	13
8.2.	ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ФЕКАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ	13
8.3.	ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ	14
8.4.	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	15
8.5.	ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НА ПРИМЕРЕ ДТ-96	16
8.5.1.	УДОБНЫЙ ЗАПУСК ДТ96	16
8.5.2.	АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	17
8.5.3.	РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ	19
8.5.3.1.	ФОРМА 1 «КОЛОНОФЛОР-8»	19
8.5.3.2.	ФОРМА 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (БИОЦЕНОЗ)»	19
8.5.3.3.	ФОРМА 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (МЕТАБОЛИЗМ)»	19
9.	УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	20
10.	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	20
11.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	21
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	22
	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	22
	ПРИЛОЖЕНИЕ	23

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «КОЛОНОФЛОР» предназначен для анализа фекальных образцов методом ПЦР в реальном времени с целью количественной оценки состояния микробиоценоза толстого кишечника и выявления дисбиотических нарушений.

2. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

2.1. Набор реагентов «КОЛОНОФЛОР» выявляет ДНК облигатных представителей микрофлоры толстого кишечника (бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки), а также условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (список выявляемых микроорганизмов в зависимости от формы выпуска набора указан в таблице 3).

2.2. Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, научные исследования. Только для исследований *in vitro*.

2.3. Целевая группа пациентов – лица мужского и женского пола от 14 лет и старше, относящиеся к европейской популяции. Диагностическая значимость исследования заключается в выявлении изменений микробного состава кишечника, свидетельствующих о нарушении иммунного и метаболического равновесия. Данные о клинической значимости обнаружения отдельных видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и изменений соотношения популяций микроорганизмов приведены в Таблице 1 Приложения 1.

2.4. Потенциальный потребитель – врачи клинико-диагностических лабораторий. Профессиональная квалификационная группа "Врачи и провизоры" всех уровней (Приказ №526 от 06.08.2007 г «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»).

2.5. Показанием к назначению исследования с применением набора «КОЛОНОФЛОР» является необходимость оценки количественного состава микробиоценоза толстого кишечника в диагностических целях или при проведении научного исследования. Противопоказанием к исследованию является период менее 2ух недель после проведенной антибактериальной терапии. Проведение исследования в эти сроки связано с риском получения недостоверных результатов.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1. ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов имеет три формы выпуска, различающиеся комплектацией – Форма 1 «КОЛОНОФЛОР-8», Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)» и Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)». Перечень определяемых микроорганизмов для каждой формы выпуска приведен в Таблице 3.

Форма 1 «КОЛОНОФЛОР-8» рассчитана на проведение 24 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор выявляет 10 показателей, включая 9 групп микроорганизмов и общее бактериальное число.

Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)» рассчитана на проведение 24 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор выявляет 23 показателя, включая 21 группу/вид микроорганизмов, общее бактериальное число и наличие генов патогенности, определяющих энтероинвазивные свойства E.coli.

Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)» рассчитана на проведение 24 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор выявляет 19 показателей, включая 18 групп микроорганизмов и общее бактериальное число.

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.

3.2. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению;
- паспорт;
- файл для количественной обработки результатов.

Комплектность набора реагентов в зависимости от формы выпуска (Форма 1 «КОЛОНОФЛОР-8», Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)», Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)») представлена в Таблице 1.

Данные о специфичности смесей для амплификации для каждой формы выпуска набора представлены в таблице 3.

3.3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ состава микробной флоры фекальных образцов предполагает проведение двухэтапного исследования:

1-ый этап – выделение ДНК;

2-ой этап - амплификация специфических участков ДНК методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала не входит в состав набора. Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплекты реагентов,

зарегистрированные в РЗН РФ и предназначенные для применения в клинической лабораторной диагностике при анализе фекальных образцов (см. п. 7 «Инструкции»).

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

Таблица 1. Форма 1 «КОЛОНОФЛОР-8»

Компонент набора	Объем компонента, мкл	Количество пробирок
Смеси для амплификации	20	24 стрипа по 8 пробирок
Раствор Taq-полимеразы	1200	2 пробирки
Минеральное масло	2000	3 пробирки
Положительный контрольный образец «ПКО»	100	1 пробирка
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	100	1 пробирка

Таблица 2. Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)»

Компонент набора	Объем компонента, мкл	Количество пробирок
Смеси для амплификации	20	48 стрипов по 8 пробирок
Раствор Taq-полимеразы	1500	3 пробирки
Минеральное масло	2000	5 пробирок
Положительный контрольный образец «ПКО-1»	200	1 пробирка
Положительный контрольный образец «ПКО-2б»	200	1 пробирка
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	200	1 пробирка

Таблица 3 Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)»

Компонент набора	Объем компонента, мкл	Количество пробирок
Смеси для амплификации	20	48 стрипов по 8 пробирок
Раствор Taq-полимеразы	1500	3 пробирки
Минеральное масло	2000	5 пробирок
Положительный контрольный образец «ПКО-1»	200	1 пробирка
Положительный контрольный образец «ПКО-2м»	200	1 пробирка
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	200	1 пробирка

Для проведения реакции используются специфические олигонуклеотидные праймеры и меченые олигонуклеотидные зонды Taqman. В присутствии фермента Taq-полимеразы происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации сопровождается отщеплением флуоресцентной метки (благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности) и появлению детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству специфических продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом.

Анализ данных осуществляется с использованием файла для количественной

обработки результатов, входящего в состав набора. Расчёт для каждого показателя производится с применением формулы, описывающей зависимость величины порогового цикла C_t от исходной концентрации фрагмента ДНК. Пересчёт значений порогового цикла C_t в количество копий на мл проводится на основе метода Пфаффа с поправкой на эффективность амплификации. Полученные значения (копий/мл) преобразуются в КОЕ/мл с учётом копийности гена, используемого для амплификации и являются окончательным результатом теста. Для получения адекватных результатов должна использоваться версия файла, прилагаемая к набору.

Набор реагентов «КОЛОНОФЛОР» включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бактериальная масса); смеси для амплификации, специфичные для каждого выявляемого вида (или группы) бактерий (перечень выявляемых микроорганизмов приведен в Таблице 4).

Набор предназначен для использования на амплификаторах детектирующих для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с регистрацией флуоресцентного сигнала по каналам FAM и HEX (ДТлайт, ДТ-прайм (производитель «ДНК-Технология»); CFX-96, MiniOpticon (производитель «BioRad»).

Для количественной обработки результатов теста, полученных с применением набора реагентов «КОЛОНОФЛОР», используется файл для обработки, входящий в состав набора. 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. Результаты исследования могут быть использованы в комплексной диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Таблица 4. Перечень выявляемых микроорганизмов, состав стрипов и каналы детекции результатов амплификации.

КОЛОНОФЛОР-8				
№ пробирки	Название смеси и канал детекции		Цвет смеси	Цвет покрытия
	FAM	HEX		
1	Общая бактериальная масса		голубой	бесцветный
2	<i>Lactobacillus</i> spp.		бесцветный	бесцветный
3	<i>Bifidobacterium</i> spp.		бесцветный	бесцветный
4	<i>Escherichia coli</i>		бесцветный	бесцветный
5	<i>Bacteroides</i> spp.		бесцветный	бесцветный
6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		бесцветный	бесцветный
7	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Klebsiella</i> spp	бесцветный	бесцветный
8	<i>Candida</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	бесцветный	бесцветный
КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)				

Стрип 1			
№ пробирки	Название смеси и канал детекции		Цвет смеси
	FAM	HEX	
1	Общая бактериальная масса		голубой
2	Lactobacillus spp.		бесцветный
3	Bifidobacterium spp.		бесцветный
4	Escherichia coli		бесцветный
5	Bacteroides spp		бесцветный
6	Faecalibacterium prausnitzii		бесцветный
7	Bacteroides thetaomicon	Akkermansia muciniphila	бесцветный
8	Enterococcus spp		бесцветный

Стрип 2			
№ пробирки	Название смеси и канал детекции		Цвет смеси
	FAM	HEX	
1	Escherichia coli enteropathogenic		голубой
2	Klebsiella pneumonia	Klebsiella oxytoca	бесцветный
3	Candida spp	Staphylococcus aureus	бесцветный
4	Clostridium difficile	Clostridium perfringens	бесцветный
5	Proteus vulgaris/mirabilis		бесцветный
6	Citrobacter spp.	Enterobacter spp.	бесцветный
7	Fusobacterium nucleatum	Parvimonas micra	бесцветный
8	Salmonella spp.	Shigella spp.	бесцветный

КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)

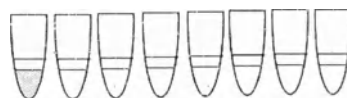
Стрип 1			
№ пробирки	Название смеси и канал детекции		Цвет смеси
	FAM	HEX	
1	Общая бактериальная масса		голубой
2	Lactobacillus spp.		бесцветный
3	Bifidobacterium spp.		бесцветный
4	Escherichia coli		бесцветный
5	Bacteroides spp		бесцветный
6	Faecalibacterium prausnitzii		бесцветный
7	Bacteroides thetaomicon	Akkermansia muciniphila	бесцветный
8	Enterococcus spp		бесцветный

Стрип 2			
№ пробирки	Название смеси и канал детекции		Цвет смеси
	FAM	HEX	
1	Blautia spp.		голубой
2	Acinetobacter spp.		бесцветный
3	Streptococcus spp.		бесцветный
4	Eubacterium rectale		бесцветный
5	Roseburia inulinivorans		бесцветный
6	Prevotella spp		бесцветный
7	Methanobrevibacter smithii	Methanosphaera stadtmanae	бесцветный
8	Ruminococcus spp		бесцветный

Рисунок 1. Схема стрипов для разных форм комплектации с изображением цвета амплификационных смесей и цвета покрывающего вещества.

Форма 1 «КОЛОНОФЛОР-8»

Стрип 1

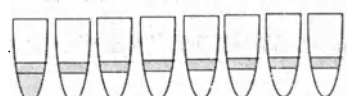


Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)»

Стрип 1

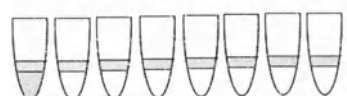
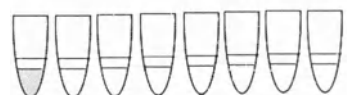


Стрип 2



Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16
(метаболизм)»

Стрип 1



3.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.4.1. Аналитическая чувствительность в отношении отдельных микроорганизмов (групп микроорганизмов) составляет:

	Смесь для амплификации	Канал детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл
1	Общая бактериальная масса	FAM	10^4
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	FAM	10^5
3	<i>Bifidobacterium</i> spp.	FAM	10^5
4	<i>Escherichia coli</i>	FAM	10^5
5	<i>Bacteroides</i> spp.	FAM	10^5
6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	10^4
7	<i>Clostridium difficile</i> / <i>Klebsiella</i> spp	FAM/HEX	$10^5/10^5$
8	<i>Candida</i> spp/ <i>Staphylococcus aureus</i>	FAM/HEX	$10^4/10^4$
9	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> / <i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM/HEX	$10^5/10^5$
10	<i>Enterococcus</i> spp.	FAM	10^5
11	<i>Escherichia coli</i> enteropathogenic	FAM	10^4
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Klebsiella oxytoca</i>	FAM/HEX	$10^5/10^5$
13	<i>Clostridium difficile</i> / <i>Clostridium perfringens</i>	FAM/HEX	$10^5/10^5$
14	<i>Proteus vulgaris</i> / <i>mirabilis</i>	FAM	10^5
15	<i>Citrobacter</i> spp./ <i>Enterobacter</i> spp.	FAM/HEX	$10^5/10^5$
16	<i>Fusobacterium nucleatum</i> / <i>Parvimonas micra</i>	FAM/HEX	$10^5/10^5$
17	<i>Salmonella</i> spp./ <i>Shigella</i> spp.	FAM/HEX	$10^4/10^4$

18	<i>Blautia</i> spp.	FAM	10 ⁵
19	<i>Acinetobacter</i> spp	FAM	10 ⁵
20	<i>Streptococcus</i> spp.	FAM	10 ⁵
21	<i>Eubacterium rectale</i>	FAM	10 ⁵
22	<i>Roseburia inulinivorans</i>	FAM	10 ⁵
23	<i>Prevotella</i> spp	FAM	10 ⁵
24	<i>Methanobrevibacter smithii</i> / <i>Methanosphaera stadmanae</i>	FAM/HEX	10 ⁵ /10 ⁵
25	<i>Ruminococcus</i> spp	FAM	10 ⁵

Важно: набор соответствует указанным значениям аналитической чувствительности при условии, что количественные значения для ПЦР-смесей всех специфичностей, рассчитанные для положительных контрольных образцов (ПКО, ПКО-1, ПКО-26 и ПКО-2м) с применением файла для обработки, соответствуют указанным в Паспорте набора.

Для прослеживаемости значений, заданных для контрольных образцов, могут быть использованы разведения эталонных штаммов микроорганизмов с использованием стандартов мутности МакФарланда и последующее измерение концентрации в образцах ДНК, выделенной из полученных разведений.

3.4.2. Аналитическая специфичность анализа при постановке теста с применением набора «КОЛОНОФЛОР» подтверждена:

- отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналам FAM и HEX в отрицательных контрольных образцах;
- методом секвенирования продуктов амплификации для каждого из определяемых показателей;
- отсутствием неспецифических перекрестных реакций при тестировании образцов ДНК, полученных из чистых культур *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp.

Таким образом, в образцах биологического материала, содержащих ДНК выявляемого микроорганизма, детектирующий амплификатор во время прохождения амплификации должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке (список выявляемых набором микроорганизмов и групп микроорганизмов представлен в таблице 4). В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемого микроорганизма, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке отсутствует.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение 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».

4.4. Утилизация отходов производится 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).

4.5. 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.

4.6. К работе с набором допускается специально обученный персонал.

4.7. Разрешается применение набора только строго по назначению, согласно данной инструкции и в пределах обозначенного срока годности.

4.8. 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.

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 мкл; 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.

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

Необходимое оборудование:

- 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 двум каналам FAM и HEX в режиме «реального времени»;

программное обеспечение для анализа результатов.

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, 2012 г.

6.2. 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.

6.3. Контейнер с материалом доставляется в лабораторию и хранится до начала исследования при + 2-8 °С. Время от взятия материала до начала исследования не должно превышать 48 часов.

6.4. При необходимости более длительного хранения материала готовят фекальную суспензию с глицерином, которую хранят в морозильной камере - при температуре не выше минус 18 °С не более 1 месяца, при температуре минус 70°С длительно. Процедура приготовления фекальной суспензии описана в п. 7.1.1. Повторное замораживание и размораживание образцов не допускается.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

7.1. Перед проведением исследования пробы биоматериала должны пройти этап предварительной обработки (см. п. 7.1. 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 (п. 7.1.2. и 7.1.4), 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 соответственно 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 10-15%. 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).

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 («Экспресс-ДНК-Био» Алкор-Био; «ДНК-сорбБ», Некст-Био).

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. ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ

Общий объем реакционной смеси – 35 мкл, включая объем 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 $n + 2$, где n – количество анализируемых образцов, два дополнительных стрипа предназначены для анализа ПКО и ОКО;

***Примечание:** При использовании Формы 1 «КОЛОНОФЛОР-8» для каждого образца необходимо подготовить один стрип. При использовании Формы 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)» и Формы 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)» для каждого образца необходимо подготовить два стрипа с разной маркировкой (стрип-1, стрип-2). Порядок расположения пробирок в стрипе строго регламентирован в таблице 3. 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, предназначенного для положительного контрольного образца по 5 мкл ПКО (для формы комплектации «Колонофлор-8»);

8.3.9. Для формы комплектации «Колонофлор-16 (биоценоз)» внести в каждую пробирку стрипа 1, предназначенного для положительного контрольного образца по 5 мкл ПКО-1; в каждую пробирку стрипа 2, предназначенного для положительного контрольного образца, внести по 5 мкл ПКО-2б;

8.3.10. Для формы комплектации «Колонофлор-16 (метаболизм)» внести в каждую пробирку стрипа 1, предназначенного для положительного контрольного образца по 5 мкл ПКО-1; в каждую пробирку стрипа 2, предназначенного для положительного контрольного образца, внести по 5 мкл ПКО-2м;

8.3.11. Установить все стрипы в блок детектирующего амплификатора вертикально, как

сверху. Для комплектаций КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз) и КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм) стрипы нужно расположить следующим образом: стрип 1, стрип 2, стрип 1 последующего образца и т.д.;

8.3.12. Запустить программу амплификации согласно инструкции к прибору с параметрами, указанными в таблице 5.

Рисунок 1. Расположение стрипов в блоке детектирующего амплификатора.

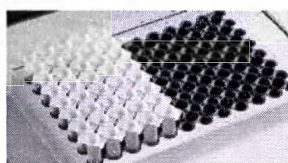


Таблица 5. Параметры программы амплификации

Режим амплификации для приборов CFX-96, MiniOpticon (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 приборов 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 и HEX

8.4. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

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

8.4.3. Данные, содержащиеся в отчёте об исследовании, подвергаются обработке с использованием файла для количественной обработки результатов анализа, входящего в состав набора.

8.5. ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ – НА ПРИМЕРЕ ДТ96

8.5.1. Удобный запуск ДТ96

8.5.1.1. Предварительно создать тест «КОЛОНОФЛОР», учитывая параметры программы амплификации, указанные в таблице 4, согласно инструкции к прибору.

8.5.1.2. При запуске теста включить опцию «Добавить тест», выбрать созданный тест «КОЛОНОФЛОР», указать количество пациентов (1), количество дублей, положительных и отрицательных контролей – 8 (для варианта «КОЛОНОФЛОР-8»), 16 (для варианта «КОЛОНОФЛОР-16»):

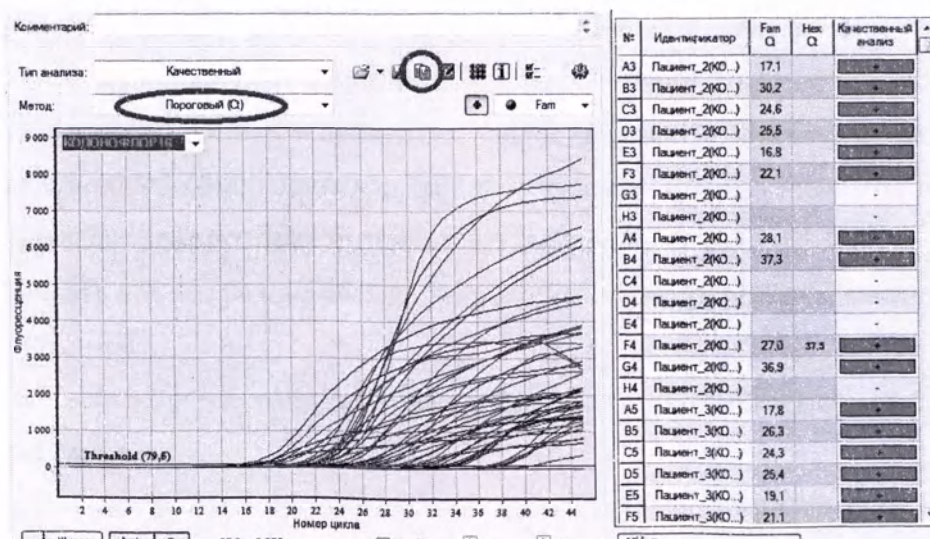
8.5.1.3. Отметить расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой, нажав кнопку «Порядок заполнения»:

8.5.1.4. Далее можно перейти к внесению фамилий или идентификационных номеров и запуску программы амплификации:

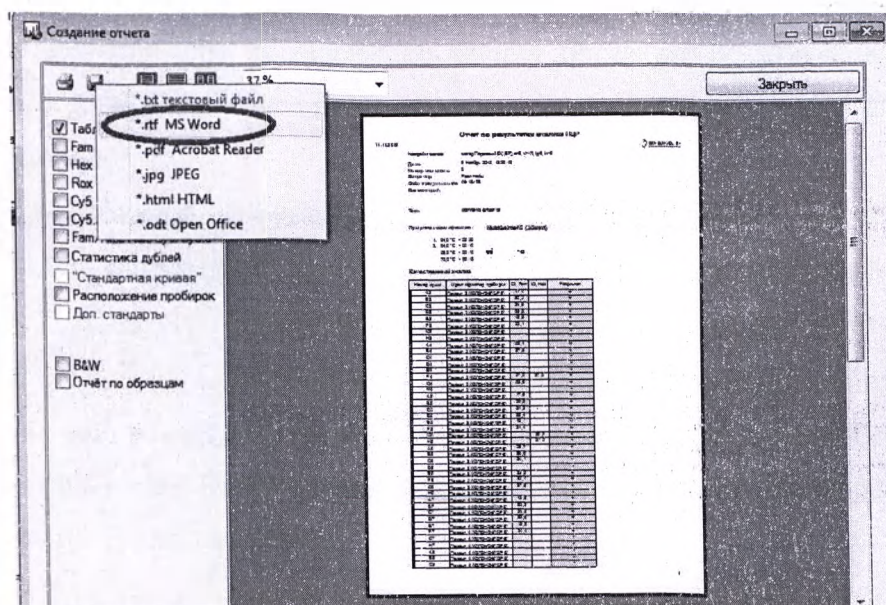
№	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Fem	Hex	Rox	Cys	С	С	С
A1	1	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
B1	2	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
C1	3	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
D1	4	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
E1	5	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
F1	6	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
G1	7	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
H1	8	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
A2	9	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
B2	10	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
C2	11	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
D2	12	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
E2	13	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
F2	14	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
G2	15	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
H2	16	Иванов	КОЛОНОФЛОР									
A3	17	Петров	КОЛОНОФЛОР									
B3	18	Петров	КОЛОНОФЛОР									
C3	19	Петров	КОЛОНОФЛОР									
D3	20	Петров	КОЛОНОФЛОР									
E3	21	Петров	КОЛОНОФЛОР									
F3	22	Петров	КОЛОНОФЛОР									
		Петров	КОЛОНОФЛОР									

8.5.2. Анализ и интерпретация результатов

8.5.2.1. По окончании программы амплификации выбрать Пороговый (Ct) метод и активировать меню «Отчет»:



и сохранить отчет в формате *.rtf:



8.5.2.2. Запустить файл для количественной обработки результатов и загрузить в него полученные данные.

8.5.2.3. Далее в верхнем меню файла нужно выбрать тип используемого прибора (детектирующего амплификатора) и формат используемого набора реагентов – КолоноФлор8, КолоноФлор16 (биоценоз) или КолоноФлор16 (метаболизм), в левом нижнем углу вписать данные о пациентах: в поле «Пациент» вносится фамилия или идентификационный номер пациента, заполнение поля «Возраст» необходимо для выдачи соответствующих референтных интервалов в заключении.

8.5.2.4. Выбрать в меню режим «Создать заключение», которое затем можно распечатать или сохранить:

8.5.2.5 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.

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

8.5.2.7. При получении количественных значений для ПКО, превышающих табличные более чем на один порядок относительно указанных в паспорте к серии набора, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. Все образцы должны быть проанализированы повторно.

8.5.2.8. При получении значений порогового цикла ниже предельно допустимых для ОКО, указанных в паспорте к серии набора, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. Необходимо проведение комплекса мероприятий для устранения контаминации; после чего все образцы данной серии должны быть проанализированы повторно.

8.5.3. Референтные интервалы¹

8.5.3.1. Форма 1 «КОЛОНОФЛОР-8»:

	Показатель	Референтный интервал (копий/мл)
1	Общая бактериальная масса	10^{11} - 10^{13}
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	10^7 - 10^8
3	<i>Bifidobacterium</i> spp.	10^9 - 10^{10}
4	<i>Escherichia coli</i>	10^6 - 10^8
5	<i>Bacteroides</i> spp.	10^9 - 10^{12}
6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	10^8 - 10^{11}
7	Соотношение <i>Bacteroides</i> spp./ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,01 - 100
8	<i>Clostridium difficile</i>	не обнаружено
9	<i>Klebsiella</i> spp	не более 10^4
10	<i>Candida</i> spp	не более 10^4
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	не более 10^4

8.5.3.2. Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)»:

	Показатель	Референтный интервал (копий/мл)
1	Общая бактериальная масса	10^{11} - 10^{13}
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	10^7 - 10^8
3	<i>Bifidobacterium</i> spp.	10^9 - 10^{10}
4	<i>Escherichia coli</i>	10^6 - 10^8
5	<i>Bacteroides</i> spp.	10^9 - 10^{12}
6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	10^8 - 10^{11}
7	Соотношение <i>Bacteroides</i> spp./ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,01 - 100
8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Допустимо любое количество
9	<i>Akkermansia muciniphila</i>	допустимо любое количество до 10^{11}
10	<i>Enterococcus</i> spp.	не более 10^8
11	<i>Escherichia coli</i> enteropathogenic	не более 10^4
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	не более 10^4
13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	не более 10^4
14	<i>Candida</i> spp	не более 10^4
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	не более 10^4
16	<i>Clostridium difficile</i>	не обнаружено
17	<i>Clostridium perfringens</i>	не обнаружено
18	<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	не более 10^4
19	<i>Citrobacter</i> spp.	не более 10^4
20	<i>Enterobacter</i> spp.	не более 10^4
21	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	не обнаружено
22	<i>Parvimonas micra</i>	не обнаружено
23	<i>Salmonella</i> spp.	не обнаружено
24	<i>Shigella</i> spp.	не обнаружено

8.5.3.3. Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)»:

	Показатель	Референтный интервал (копий/мл)
1	Общая бактериальная масса	10^{11} - 10^{13}
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	10^7 - 10^8
3	<i>Bifidobacterium</i> spp.	10^9 - 10^{10}
4	<i>Escherichia coli</i>	10^6 - 10^8
5	<i>Bacteroides</i> spp.	10^9 - 10^{12}

¹ Референтные интервалы для всех форм комплектации набора (Форма 1 «КОЛОНОФЛОР-8», Форма 2 «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)», Форма 3 «КОЛОНОФЛОР-16 (метаболизм)») отражают диапазон значений для здоровых доноров (возрастная группа от 14 лет) без предъявляемых жалоб со стороны желудочно-кишечного тракта.

6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	10^8-10^{11}
7	Соотношение <i>Bacteroides</i> spp./ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,01 - 100
8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	допустимо любое количество
9	<i>Akkermansia muciniphila</i>	допустимо любое количество до 10^{11}
10	<i>Enterococcus</i> spp.	не более 10^8
11	<i>Blautia</i> spp.	10^8-10^{11}
12	<i>Acinetobacter</i> spp	не обнаружено
13	<i>Eubacterium rectale</i>	10^8-10^{11}
14	<i>Streptococcus</i> spp.	не обнаружено
15	<i>Roseburia inulinivorans</i>	допустимо любое количество до 10^{10}
16	<i>Prevotella</i> spp	допустимо любое количество до 10^{11}
17	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	10^6-10^{10}
18	<i>Methanospaera stadmanae</i>	не более 10^6
19	<i>Ruminococcus</i> spp	допустимо любое количество до 10^{11}

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 9.1. Срок годности набора реагентов – 6 месяцев с даты изготовления.
- 9.2. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.
- 9.3. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.
- 9.4. Транспортирование набора реагентов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре + 2-8 °С в течение всего срока годности набора.
- 9.5. Условия хранения отдельных компонентов набора реагентов «КОЛОНОФЛОР» указаны на упаковке. Стрипы со смесями для амплификации необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре от + 2 до + 8 °С. Раствор Таq-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. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

11.2. По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Альфалаб», Санкт Петербург, ул. Академика Павлова 14а, info@alphalabs.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ПЦР- полимеразная цепная реакция

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПКО- положительный контрольный образец

ОКО- отрицательный контрольный образец

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ:



Номер серии



Только для in vitro диагностики



Дата изготовления



Срок годности



Хранить при температуре



Беречь от солнечных лучей

Согласовано

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

« 24 »

10

2019г.

М.П.



Варнавичус П.К.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 22 ЛИСТОВ

201 9 год



Ген. Директор
ООО «ВИМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Гарнавичус Г.К.

Прошито и пронумеровано
В количестве 22 листов

Генеральный директор ООО «Альфалаб»



Суворова М.А.