«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«__» декабря 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения доли условно-патогенных микроорганизмов и доли лактобактерий в общей бактериальной массе методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест Биофлор»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения доли условно-патогенных микроорганизмов и доли лактобактерий в общей бактериальной массе методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест Биофлор» предназначен для определения доли условно-патогенных микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella species*, *Leptotrichia amnionii group*, *Streptococcus species*, *Enterococcus species* и *Staphylococcus species*) и доли лактобактерий (*Lactobacillus species*) в общей бактериальной массе методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических образцов (цервикальных и вагинальных соскобов) проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест ДНК-экспресс» и «Лизующий раствор».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма Bio-Rad, США); «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами, зарегистрированными в установленном порядке в РФ.

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК анализируемых маркеров в ходе проведения ПЦР.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК анализируемого маркера, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'–3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК детектируемых бактерий в образце.

Определение суммарного количества бактерий в анализируемой пробе, суммарного количества лактобактерий, суммарного количества условно-патогенных микроорганизмов и отношения этих величин обеспечено применением в каждой постановке положительного контрольного образца №1 (ПКО1) с охарактеризованной концентрацией ДНК лактобактерий в общей бактериальной массе и положительного контрольного образца №2 (ПКО2), содержащего ДНК условно-патогенных микроорганизмов и геномную ДНК человека. ПКО1 служит образцом сравнения для расчёта концентраций ДНК бактерий в образцах.

Как ПКО1, так и ПКО2 подвергаются процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми образцами.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание геномной ДНК человека (гена *HMBS*) с целью валидации качества забора материала.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) *Описание.*	**Количество**
Положительный контрольный образец №1(ПКО1) *Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)*	2 пробирки по 1 мл
Положительный контрольный образец№2 (ПКО2) *Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)*	2 пробирки по 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС 1, 2, 3, 4) *Лиофилизированная*	4 планшета по 96 пробирок
Оптическая пленка	6 листов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность:

- чувствительность выявления ДНК *Lactobacillus species* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-508), с содержанием ДНК *Lactobacillus species* 100 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК гена *16S pPHK* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-508), с содержанием ДНК гена *16S pPHK* (гена консервативного для всех видов бактерий) 10^4 копий в пробе – 100%.

- чувствительность выявления ДНК *Gardnerella vaginalis* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-507), с содержанием ДНК *Gardnerella vaginalis* 100 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК *Atopobium vaginae* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-507), с содержанием ДНК *Atopobium vaginae* 100 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК гена *HMBS* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-389), с содержанием ДНК гена *HMBS* 250 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК *Prevotella species* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-506), с содержанием ДНК *Prevotella species* 100 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК *Leptotrichia amnionii group* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-506), с содержанием ДНК *Leptotrichia amnionii group* 100 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК *Streptococcus species* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-743), с содержанием ДНК *Streptococcus species* 100 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК *Enterococcus species* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-767), с содержанием ДНК *Enterococcus species* 100 копий в пробе.

- чувствительность выявления ДНК *Staphylococcus species* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-768), с содержанием ДНК *Staphylococcus species* 100 копий в пробе.

3.2. Для оценки аналитической специфичности были проведены проверки с потенциально интерферирующими ДНК микроорганизмов: *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria*

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum; Ureaplasma parvum; Neisseria spp., *Trichomonas vaginalis, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii, Candida* spp., *Enterobacter aglomerans, Enterobacter cloacae, Acinetobacter baumannii, Klebsiella oxitoca, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Eischerichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Corynebacterium spp*. Перекрестно реагирующих ДНК обнаружено не было.

3.3. Диагностическая чувствительность:

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*: клинические испытания, проведенные на 43 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 93,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Atopobium vaginae*: клинические испытания, проведенные на 24 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 88,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Prevotella species*: клинические испытания, проведенные на 37 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 92,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Leptotrichia amnionii group*: клинические испытания, проведенные на 15 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 81,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Streptococcus species*: клинические испытания, проведенные на 33 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 91,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Enterococcus species*: клинические испытания, проведенные на 10 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 74,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Staphylococcus species*: клинические испытания, проведенные на 26 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 89,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Lactobacillus species*: клинические испытания, проведенные на 98 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность:

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*: клинические испытания, проведенные на 67 отрицательных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 95,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Atopobium vaginae*: клинические ис-

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

пытания, проведенные на 86 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 96,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность чувствительность выявления ДНК *Prevotella species*: клинические испытания, проведенные на 73 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 96,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Leptotrichia amnionii group*: клинические испытания, проведенные на 95 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 96,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Streptococcus species*: клинические испытания, проведенные на 77 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 96,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Enterococcus species*: клинические испытания, проведенные на 100 отрицательных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Staphylococcus species*: клинические испытания, проведенные на 84 отрицательных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 96,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Lactobacillus species*: клинические испытания, проведенные на 12 отрицательных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 77,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

4.3. ПКО1 и ПКО2 содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

4.8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (*такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»*).

4.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.11. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа (с каналами детекции «FAM», «HEX», «ROX» и «Cy5») «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США); «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном порядке в РФ;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 8000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

– мини-шейкер, обеспечивающий перемешивание реагентов в планшетах с частотой 1200 об/мин (например, «PSU-2T», фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», США);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «SSI», США);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);

– нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Для анализа используется ДНК, выделенная из клинических образцов (цервикальных и вагинальных соскобов) с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «Лизующий раствор» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО1 и ПКО2, которые являются компонентами данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 4 ОКО, 1 ПКО1 и 3 ПКО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой. Для выявления ДНК условно-патогенных микроорганизмов, ДНК общей бактериальной массы, ДНК лактобактерий и геномной ДНК человека, для каждого исследуемого образца ис-

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

пользуется 4 пробирки ГРС (см. рисунок).

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. ПКО1 и ПКО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

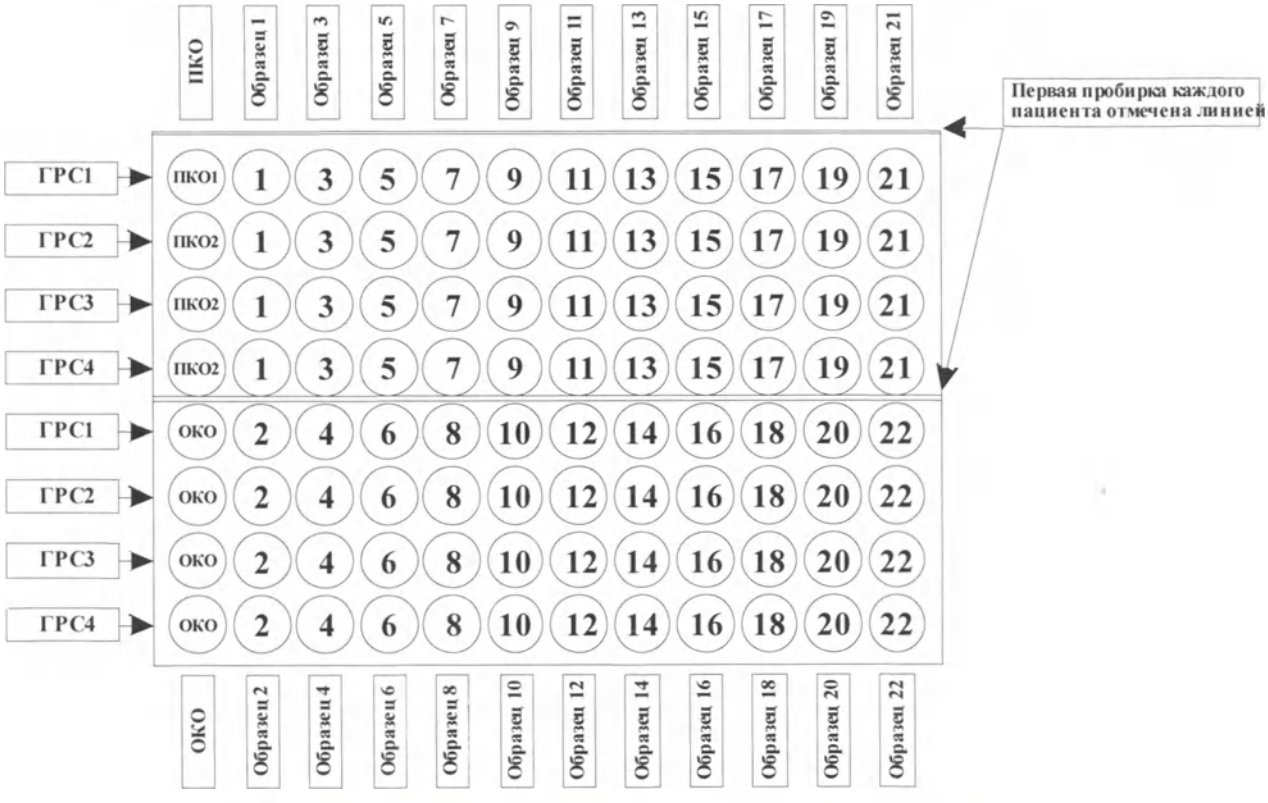
Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

Рисунок

Рекомендованный порядок установки пробирок в амплификатор



Для анализа каждого образца используется 4 пробирки

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК *Lactobacillus species*, ДНК *гена 16S рРНК*, ДНК *HMBS*, ДНК *Gardnerella vaginalis*, ДНК *Atopobium vaginae*, ДНК *Prevotella species*, ДНК *Leptotrichia amnionii group*, ДНК *Streptococcus species*, ДНК *Enterococcus species*, ДНК *Staphylococcus species* и ВКО и детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

Протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд)*.

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.5. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК аналитов:

«Cy5» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«FAM», «HEX» и «ROX» – для регистрации сигнала ДНК условно-патогенных микроорганизмов, ДНК общей бактериальной массы, ДНК лактобактерий и геномной ДНК человека (см. таблицу 1).

7.6. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору.

7.7. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

Таблица 1

Номер пробирки (ГРС)	**Аналит**	**Канал**	**Граничные значения порогового цикла**
1	ВКО	Cy5	40
	Общая бактериальная масса	ROX	28
	Lactobacillus species	HEX	32
2	ВКО	Cy5	40
	Gardnerella vaginalis	HEX	32
	Atopobium vaginae	ROX	32
3	ВКО	Cy5	40
	HMBS	FAM	32
	Prevotella species	HEX	32
	Leptotrichia amnionii group	ROX	32
4	ВКО	Cy5	40

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Номер пробирки (ГРС)	Аналит	Канал	Граничные значения порогового цикла
	Streptococcus species	FAM	32
	Enterococcus species	HEX	32
	Staphylococcus species	ROX	32

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО1 программа должна фиксировать:

–нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

–нарастание сигнала амплификации ДНК лактобактерий (канал «HEX») и ДНК общей бактериальной ДНК (канал «ROX») и определять значения пороговых циклов Ct по каналам «HEX» и «ROX», которые должны быть меньше или равны соответственным граничным значениям, указанным в таблице 1.

8.1.2. В ПКО2 программа должна фиксировать:

–нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

–нарастание сигнала амплификации ДНК (канал «FAM» кроме ГРС2), (каналы «HEX» «ROX») и определять значения пороговых циклов Ct по каналам «FAM» (кроме ГРС2), «HEX» и «ROX», которые должны быть меньше или равны соответственным граничным значениям, указанным в таблице 1.

8.1.3. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять Ct ВКО. Значения, определяемых пороговых циклов Ct по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» для специфических фрагментов ДНК, должны быть больше соответствующих граничных значений, указанных в таблице 1 или не определяться.

8.1.4. В каждом исследуемом образце, во всех ГРС, программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять Ct ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1 Вычислить $(Ct\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов, в каждой из ГРС, (включая ПКО1, ПКО2 и ОКО). Отбраковке подлежат образцы, значения Ct ВКО которых, хотя бы в одной из ГРС, отличаются более чем на 2 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(Ct\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся образцов.

8.2.2. Для образца может быть достоверно вычислено относительное содержание ДНК *Lactobacillus species* и ДНК условно-патогенных микроорганизмов в пробе при выполнении следующих условий, суммированных в таблице 2.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 2

Ct («Cy5», ВКО)	Ct («ROX», общая бактериальная ДНК в ГРС1)	Ct («FAM», HMBS в ГРС3)	Достоверность результата количественного анализа	Действия
Отличается от $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2	Не имеет значения	Не имеет значения	Недостоверен	Повторить анализ, начиная со стадии забора пробы
Отличается от $(Ct\ ВКО)_{ср}$ не более чем на 2	Ct > 28	Ct>32	Недостоверен	Повторить анализ, начиная со стадии забора пробы
Отличается от $(Ct\ ВКО)_{ср}$ не более чем на 2	Ct ≤ 28	Не имеет значения	Достоверен	Для образца может быть достоверно вычислено относительное содержание ДНК лактобактерий и ДНК условно-патогенных микроорганизмов в пробе

8.2.3. Для определения количества ДНК общей бактериальной массы в образце *(в копиях на пробу)* вычисляется разница значения порогового цикла (Ct) в ГРС1 по каналу ROX, определяемого для образца ПКО1 – (Ct ПКО1), который используются в качестве образца сравнения, и значения Ct в ГРС1 по каналу ROX, определяемого для анализируемого образца (Ct_k).

Концентрация ДНК общей бактериальной массы (ОБМ), *Lactobacillus species* (Lact) и условно патогенных микроорганизмов (УПМ) в анализируемой пробе может быть вычислена по формулам (см. таблицу 3):

Таблица 3

	Формула для расчёта концентрации	Формула для расчета доли
ОБМ	$C_k(ОБМ) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(ROX\ ГРС1))}$	
Lactobacillus species	$C_k(Lact) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(HEX\ ГРС1) - Ct_k(HEX\ ГРС1))}$	$\%C_k(Lact) = \frac{C_k(Lact)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$
Gardnerella vaginalis	$C_k(Gva) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(HEX\ ГРС2))}$	$\%C_k(Gva) = \frac{C_k(Gva)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$
Atopobium vaginae	$C_k(Avag) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(ROX\ ГРС2))}$	$\%C_k(Avag) = \frac{C_k(Avag)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$
Prevotella species	$C_k(Prev) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(HEX\ ГРС3))}$	$\%C_k(Prev) = \frac{C_k(Prev)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Leptotrichia amnionii group	$C_k(Lept) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(ROX\ ГРС3))}$	$\%C_k(Lept) = \frac{C_k(Lept)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$
Streptococcus species	$C_k(Str) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(FAM\ ГРС4))}$	$\%C_k(Str) = \frac{C_k(Str)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$
Enterococcus species	$C_k(Ent) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(HEX\ ГРС4))}$	$\%C_k(Ent) = \frac{C_k(Ent)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$
Staphylococcus species	$C_k(Sta) = C_{ПКО1} \times 2^{(Ct_{ПКО1}(ROX\ ГРС1) - Ct_k(ROX\ ГРС4))}$	$\%C_k(Sta) = \frac{C_k(Sta)}{C_k(ОБМ)} \times 100\%$

k – номер образца;

$C_{ПКО1}$ – концентрация суммарной ДНК общей бактериальной массы и ДНК *Lactobacillus sp.* в ПКО1 (информация в паспорте серии набора);

C_k *(ОБМ)* – концентрация суммарной ДНК общей бактериальной массы в образце *k*;

$Ct_{ПКО1}$*(ROX ГРС1)* и Ct_k*(ROX ГРС 1)* – значение Ct ПКО1 и значение *Ct* образца *k* по каналу *«ROX»* в ГРС1;

C_k *(Lact)* – концентрация ДНК *Lactobacillus sp.* в образце *k*;

$Ct_{ПКО1}$*(HEX ГРС1)* и Ct_k*(HEX ГРС1)* – значение Ct ПКО1 и значение *Ct* образца *k* по каналу *«HEX»* в ГРС1;

C_k *(Gva)* – концентрация ДНК *Gardnerella vaginalis* в образце *k*;

Ct_k*(HEX ГРС2)* – значение *Ct* образца *k* по каналу *«HEX»* в ГРС2;

C_k *(Avag)* – концентрация ДНК *Atopobium vaginae* в образце *k*;

Ct_k*(ROX ГРС 2)* – значение *Ct* образца *k* по каналу *«ROX»* в ГРС2;

C_k *(Prev)* – концентрация ДНК *Prevotella species* в образце *k*;

Ct_k*(HEX ГРС 3)* – значение *Ct* образца *k* по каналу *«HEX»* в ГРС 3;

C_k *(Lept)* – концентрация ДНК *Leptotrichia amnionii group* в образце *k*;

Ct_k*(ROX ГРС 3)* – значение *Ct* образца *k* по каналу *«ROX»* в ГРС3;

C_k *(Str)* – концентрация ДНК *Streptococcus species* в образце *k*;

Ct_k*(FAM ГРС 4)* – значение *Ct* образца *k* по каналу *«FAM»* в ГРС4;

C_k *(Ent)* – концентрация ДНК *Enterococcus species* в образце *k*;

Ct_k*(HEX ГРС 4)* – значение *Ct* образца *k* по каналу *«HEX»* в ГРС4;

C_k *(Sta)* – концентрация ДНК *Staphylococcus species* в образце *k*;

Ct_k*(ROX ГРС4)* – значение *Ct* образца *k* по каналу *«ROX»* в ГРС4.

Если значение порогового цикла Ct_k больше соответствующего граничного значения или не определяется, то концентрация C_k равна 0.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 4

Соотношение	**Заключение**
Доля лактобактерий >80%, УПМ не обнаружены или обнаружены ≤10%	Состав микрофлоры соответствует условной норме
Доля лактобактерий >80%, УПМ обнаружены >10%	Состав микрофлоры соответствует условной норме
Доля лактобактерий 20-80%, УПМ обнаружены ≤10%, или не обнаружены	Состав микрофлоры соответствует переходному состоянию (умеренный дисбиоз). Вероятно присутствуют бактерии не выявляемые в данном тесте
Доля лактобактерий 20-80%, УПМ обнаружены >10%	Состав микрофлоры соответствует переходному состоянию (умеренный дисбиоз). По количественным показателям доли УПМ, возможно определить видовой состав микрофлоры
Доля лактобактерий 0-20%, УПМ обнаружены ≤10%, или не обнаружены	Состав микрофлоры соответствует выраженному дисбиозу. Вероятно присутствуют бактерии не выявляемые в данном тесте
Доля лактобактерий 0-20%, УПМ обнаружены >10%	Состав микрофлоры соответствует выраженному дисбиозу. По количественным показателям доли УПМ, возможно определить видовой состав микрофлоры

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «**РеалБест Биофлор**», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест» А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест» В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор Т.И. Поспелова

м.п.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 14 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России
_____ Захарова Л.Н.
"21" 12 2019 г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU