ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Фемофлор

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЦЕНОЗА УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАНТОВ

В пособии для врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-клиницистов (акушеров-гинекологов, дерматовенерологов) описан лабораторный метод анализа условно-патогенной флоры урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени:

- количественная оценка общей бактериальной массы
- количественная оценка нормофлоры (Lactobacillus spp.)
- количественная оценка различных групп микроорганизмов условно-патогенной флоры и выявление соотношений между ними и общей бактериальной массой
- контроль взятия материала

Пособие предназначено для врачей клинической лабораторной диагностики, работающих с методом ПЦР, заведующих лабораториями и врачей-клиницистов (акушеров-гинекологов, дерматовенерологов и т.д.)

Составители: Болдырева Маргарита Николаевна,
Донников Андрей Евгеньевич,
Тумбинская Лидия Викторовна.

ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....4

Получение и обработка материала для исследований.....5

Описание исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени.....8

Проведение анализа.....14

Алгоритм формирования лабораторного заключения.....28

Показания и противопоказания к применению метода.....32

Параметры тестов. Приложение 1.....34

Примеры интерпретации результатов исследования. Приложение 2.....41

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания урогенитального тракта занимают ведущее место в структуре акушерских и гинекологических патологий. Часть этих патологий может протекать бессимптомно или со слабо выраженной симптоматикой, что не вызывает беспокойства у женщины или воспринимается как вариант нормы.

В связи с этим возникла настоятельная потребность в разработке и внедрении в практическое здравоохранение новых диагностических подходов, позволяющих своевременно (до развития осложнений) диагностировать заболевания урогенитального тракта у женщин. Подобные новые диагностические подходы необходимы для определения объема медикаментозного вмешательства и осуществления объективного контроля эффективности лечения и выздоровления пациенток.

На сегодняшний день метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) широко используется в российской лабораторной практике для идентификации условно-патогенной микробиоты урогенитального тракта — ***Gardnerella vaginalis***, ***Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealiticum, Ureaplasma parvum*** и т.д. Однако «классическая» ПЦР с регистрацией результата по окончании реакции (форез, флуоресцентная детекция) позволяющая идентифицировать любые микроорганизмы до вида без проведения микроскопии и культурального исследования, не предполагает их количественной характеристики и не дает представления о соотношении количеств микроорганизмов в исследуемом материале. В то же время дисбиотические процессы характеризуются нарушением количественных соотношений нормо- и условно-патогенной микрофлоры. Понятие «дисбиоз» не является самостоятельной нозологической единицей, а представляет собой целый спектр патологических состояний разной степени выраженности. Качественная оценка методом ПЦР не позволяет определить этиологическое значение тех или иных микроорганизмов в развитии дисбиотических нарушений и степени их выраженности, что, в свою очередь, может привести к диагностическим ошибкам и назначению неадекватной терапии, в ряде случаев, усугубляющей заболевание.

Метод ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (РТ ПЦР) позволяет проводить многофакторный количественный анализ условно патогенной флоры урогенитального тракта, что является принципиально новым подходом к диагностике состояния женщины и может служить чувствительным инструментом для исследования биоценоза.

Клиническое значение исследования состояния биоценоза урогенитального тракта у женщин заключается в определении общего количества микроорганизмов и оценке соотношения различных групп условно-патогенных микроорганизмов и нормофлоры. Преобладание в биоценозе тех или иных групп микроорганизмов может дать врачу дополнительную информацию о необходимости и объеме назначаемой терапии. Биоценоз урогенитального тракта женщины является сложной системой, составляющей единое целое с эпителиальными клетками человека, и зависит от множества внутренних и внешних факторов, которые необходимо учитывать при назначении исследования.

Масштабные многоцентровые исследования подтвердили клиническую значимость предлагаемого подхода и хорошую воспроизводимость полученных результатов. Была отмечена высокая корреляция полученных результатов с культуральным и микроскопическим методами, при более высокой чувствительности ПЦР в выявлении трудно-культивируемых анаэробных микроорганизмов.

Предлагаемый подход рекомендован для современных ПЦР-лабораторий, оснащенных амплификаторами с детекцией результатов в режиме реального времени.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Общие требования

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

Исследование урогенитального биоценоза методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, то есть образец биоматериала анализируется на наличие и количество ДНК нормо- и условно-патогенной микрофлоры.

При проведении анализа реагентами серии Фемофлор анализируется качество взятия биоматериала врачом-клиницистом при помощи количественной оценки геномной ДНК человека.

Материал для исследований

В основном, материалом для анализа служат соскобы с задне-бокового свода влагалища, однако, по усмотрению врача это могут быть соскобы из цервикального канала и уретры. Поскольку ПЦР является прямым методом лабораторной диагностики, в целях уменьшения рисков получения ложноотрицательных результатов рекомендуется брать материал из места предполагаемой локализации инфекционного процесса.

Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию (влагалище, уретра, цервикальный канал) для анализа урогенитальной биоты принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

Для исследования биоценоза урогенитального биотопа у женщин используют соскобы эпителиальных клеток из влагалища (заднебоковые своды)

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

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

Биоматериал забирают в пробирку 1,5 мл «эппендорф» с транспортной средой (физ. раствор или «Проба-Рапид» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Порядок взятия материала в пробирку с транспортной средой

1. Открыть крышку пробирки

2. С помощью одноразового зонда сделать соскоб эпителиальных клеток из соответствующего биотопа (влагалище, уретра, цервикальный канал). Перенести зонд с биоматериалом в пробирку с транспортной средой, зонд тщательно прополоскать в транспортной среде, затем извлечь и удалить[1] (при необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов, повторить процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку).

3. Пробирку плотно закрыть крышкой, промаркировать.

Особенности взятия материала из влагалища

Материалом для лабораторного исследования из влагалища служит отделяемое заднебоковых сводов влагалища. Материал должен быть взят ДО проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано.

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

Особенности взятия материала из уретры

◆ Перед взятием биоматериала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5-2 часов;

◆ непосредственно перед взятием биоматериала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном (который можно смочить стерильным физиологическим раствором);

◆ при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия биоматериала;

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

1. Утилизация производится в соответствии с действующими нормативными документами.

Особенности взятия материала из цервикального канала

◆ Перед взятием материала необходимо УДАЛИТЬ ватным тампоном СЛИЗЬ и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;

◆ зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5-1,5 см;

◆ при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание стенок влагалища.

Условия хранения и доставки материала

Взятый биологический материал должен быть промаркирован. В сопроводительном документе-направлении необходимо указать: фамилию, имя, отчество, возраст пациента, материал, предполагаемый диагноз, показания к обследованию, дату взятия пробы, наименование учреждения, направляющего материал (Приказ МЗ СССР №1030 от 04.10.80). Кроме того, следует указать день менструального цикла или причину отсутствия менструального цикла (менопауза, аменорея и т.п.)

Материал доставляется в лабораторию лицами, получившими специальный инструктаж, с учетом правил транспортировки.

Если время транспортировки биологического материала с момента взятия до момента его доставки в лабораторию не более суток, то пробирку с биоматериалом необходимо хранить и доставлять в лабораторию при температуре бытового холодильника (+ 4—10 °С), не замораживая.

В случае невозможности доставки образца в лабораторию в течение суток, допускается однократное замораживание и хранение образца биоматериала при -20 °С до 1-го месяца.

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЦЕНОЗА УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Для исследований биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени используют комплекты реагентов ФЕМОФЛОР (производитель: ООО «НПО ДНК-Технология», РУ ФСР 2009/04663, Патент №2008 105 063 от 13.02.2008 «Способ диагностики дисбаланса микробиоты различных биотопов человека и степени его выраженности»).

Область применения

Набор реагентов Фемофлор предназначен для исследования состояния биоценоза урогенитального тракта у женщин методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени.

Набор реагентов Фемофлор предназначен для выявления ДНК условно-патогенных микроорганизмов, ДНК лактобактерий и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала). Данное исследование предназначено для исследования качественного и количественного состава биоценоза урогенитального тракта.

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

Принцип действия

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

Набор реагентов Фемофлор включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бакмасса), смесь, специфичную для нормофлоры (Lactobacillus spp) и смеси, специфичные для условно-патогенных микроорганизмов (разные составы в зависимости от комплектации Фемофлор-16, Фемофлор-8, Фемофлор-4). Комплектации приведены в таблице 1.

В наборе реагентов Фемофлор в одну из пробирок со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции. Одна из пробирок содержит смесь для амплификации геномной ДНК человека, предназначенная для контроля взятия клинического материала.

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

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации ДНК общей бакмассы, лактобактерий и большинства условно-патогенных микроорганизмов, помечены флуоресцентными метками FAM, ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации внутреннего контрольного образца, контроля взятия материала и микоплазмы генитальной, помечены HEX.

Пробирки для амплификации различных мишеней объединены в стрип по 8 пробирок. В зависимости от комплектации набора на одного пациента используется два, один или половина (4 пробирки) стрипа.

Использование двух флуоресцентных красителей (FAM и HEX) позволяет сократить количество пробирок, так как позволяет одновременно регистрировать результаты двух разных реакций амплификации, одновременно проходящих в одной пробирке.

Для проведения ПЦР используют детектирующий амплификатор ДТ-96 (или аналог).

После прохождения амплификации, по показателю индикаторного цикла программно рассчитывается количество общей бакмассы, лактобактерий и каждого из условно-патогенных микроорганизмов. По их соотношению можно судить о состоянии биоценоза. Для исключения ложноотрицательных результатов учитывается показатель амплификации геномной ДНК человека (контроль взятия биологического материала).

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

В определенные пробирки (см. табл.1) добавлен олигонуклеотид, меченный ROX. Он используется программным обеспечением прибора ДТ-96 как маркер определения положения стрипа в плашке.

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

Таблица 1. Формы комплектации набора реагентов Фемофлор, маркировка и состав стрипов со смесью для амплификации

Фемофлор 16			
№ пробирки в ПО	Название смеси	цвет буфера	цвет парафина
Стрип-1			
A	Общая бактериальная масса	голубой	белый
B	Нормофлора – Lactobacillus spp.* / ВК	бесцветный	
C	Enterobacterium spp.		
D	Streptococcus spp.		
E	Staphylococcus spp./ Маркер		
F	Gardnerella vaginalis/ Prevotella bivia/ Porphyromonas spp.		
G	Eubacterium spp.		
H	Sneathia spp./ Leptotrihia spp./ Fusobacterium spp.		
Стрип-2			
A	Megasphaera spp./ Veillonella spp./ Dialister spp.	голубой	голубой
B	Lachnobacterium spp./ Clostridium spp.	бесцветный	
C	Mobiluncus spp./ Corynebacterium spp.		
D	Peptostreptococcus spp.		
E	Atopobium vaginae		
F	Mycoplasma genitalium + hominis		
G	Ureaplasma (urealyticum + parvum)		
H	Candida spp./ контроль взятия материала/ Маркер		
Фемофлор 8			
№ пробирки в ПО	Название смеси	цвет буфера	цвет парафина
A	Общая бактериальная масса	голубой	белый
B	Нормофлора – Lactobacillus spp. /ВК	бесцветный	
C	Enterobacterium spp.		
D	Streptococcus spp.		
E	Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.		
F	Eubacterium spp.		
G	Mycoplasma genitalium + hominis		
H	Candida spp./контроль взятия материала/Маркер		

Фемофлор 4			
№ пробирки в ПО	Название смеси	цвет буфера	цвет парафина
A/E	Общая бактериальная масса	голубой	белый
B/F	Нормофлора – Lactobacillus spp. /ВК	бесцветный	
C/G	Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.		
D/H	Candida spp./контроль взятия материала / Маркер		

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

Состав набора

Набор выпускается в трёх вариантах комплектации, в зависимости от выявляемых условно-патогенных микроорганизмов:

Фемофлор 16 предназначен для проведения 12 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор выявляет 18 показателей, включая 23 группы микроорганизмов, контроль взятия материала и общую бактериальную массу.

Фемофлор 8 предназначен для проведения 24 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор выявляет 11 показателей, включая 9 групп микроорганизмов, контроль взятия материала и общую бактериальную массу.

Фемофлор 4 предназначен для проведения 48 тестов, включая исследование положительных и отрицательных контрольных образцов. Набор выявляет 6 показателей, включая 5 групп микроорганизмов контроль взятия материала и общую бактериальную массу.

Набор включает следующие реагенты:

- смесь для амплификации, запечатанная парафином – 24 стрипа по 8 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq-полимеразы - 4 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло - 4 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец – 1 пробирка (160 мкл).

Варианты комплектации набора Фемофлор 16, Фемофлор 8, Фемофлор 4 различаются составами смеси для амплификации, запечатанной парафином и маркировкой стрипов. Информация о маркировке и составе стрипов представлена в таблице 1.Время проведения анализа, включая пробоподготовку – 3 часа.

Чувствительность

Диагностическая чувствительность данного исследования для выявления дисбиотических состояний составляет 88,7%, специфичность – 89,6%.

Для бактериального вагиноза чувствительность исследования достигает 95%.

Специфичность

Специфичность данного набора реагентов подтверждена сиквенсом 16s РНК.

Аналитические характеристики

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

Линейный диапазон составляет:

для уреаплазм 0-10^9 ГЭ/образец

для общей бактериальной массы 10^4-10^{10} ГЭ/образец

для остальных микроорганизмов 10^3-10^{10} ГЭ/образец

Контроль взятия материала

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

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

Меры предосторожности

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

Мерами предосторожности при работе с набором реагентов Фемофлор является соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Работу с набором реагентов и анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька.

На стадиях приготовления реакционной смеси и обработки образцов урогенитальных соскобов необходимо использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов урогенитальных соскобов.

Выделение ДНК и приготовление реакционной смеси следует проводить в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком или ПЦР-боксах.

Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК и ПЦР следует проводить в раздельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Оборудование и материалы

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с набором реагентов Фемофлор требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий, например ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ ФСР 032а1348/1162-05) или аналоги;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 3000 – 13000 об/мин (10 000 g) (Eppendorf MiniSpin);
- термостат твердотельный на 50-95 °С;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5-10 мкл, 5-40 мкл, 40-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free" объемом 1-20 мкл; 1-50 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- контейнер с дезинфицирующим раствором
- маркер лабораторный тонкий.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

При использовании для взятия биологического материала пробирок со стерильным физиологическим раствором выделение ДНК рекомендуется проводить с использованием комплектов реагентов «Проба-НК» или «Проба-ГС» (производства ООО «НПО ДНК-Технология»). При использовании для взятия биологического материала пробирок «Проба-Рапид» (производства ООО «НПО ДНК-Технология») выделение ДНК необходимо проводить только с использованием комплекта «Проба-НК».

Выделение ДНК из урогенитальных соскобов

Выделение ДНК из урогенитальных соскобов с использованием комплекта реагентов «Проба-НК»

- Пробирки, содержащие анализируемый материал, необходимо центрифугировать в течение 10 мин при 13000 об/мин.
- Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
- Добавить в каждую пробирку 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь её края.
- Добавить в пробирку, маркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца.
- Плотно закрыть крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с.
- Термостатировать пробирки 15 мин при 65 °С, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.
- Добавить 400 мкл реагента для преципитации и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.
- Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

- Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и 3-5 раз аккуратно перевернуть пробирку.
- Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и 3-5 раз аккуратно перевернуть пробирку.
- Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- Добавить к осадку 400 мкл буфера для растворения. Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадить капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.
- Прогреть пробирки при 65 °С в течение 10 мин. Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- Осадить капли центрифугированием пробирок при 13000 об/мин в течение 30 с.

Препарат НК готов для проведения ПЦР (ДНК).

Препарат ДНК можно хранить при —20 °С в течение 1 месяца или при —70 °С в течение 1 года.).

Выделения ДНК из урогенитальных соскобов с использованием комплекта реагентов «Проба-ГС»

Примечание. Перед началом работы достать из холодильника комплект реагентов для выделения ДНК и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе и промывочном растворе №1. В случае выпадения осадка, растворы прогреть при 50 °С до полного растворения осадка.

На данном этапе использовать только наконечники с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free».

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

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

Внимание! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести пробоподготовку отрицательного контрольного образца («К-») полностью аналогично процедуре выделения ДНК из исследуемых образцов (см. п. «Выделение ДНК из урогенитальных соскобов»). В качестве К- в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл необходимо внести 50 мкл физиологического раствора стерильного. Положительный контрольный образец К+ готов к употреблению и не требует пробоподготовки.

- Для обработки нескольких образцов с учётом «К-» (N), смешайте в отдельной пробирке 150х(N+1) мкл лизирующего раствора и 20х(N+1) предварительно ресуспендированного сорбента.

- Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом и встряхните пробирку на вортексе в течение 3—5 с.
- Термостатировать пробирку при 50 °С в течение 20 мин .
- Центрифугировать пробирку в течение 1 мин при 13000 об/мин.
- Удалить надосадочную жидкость.
- Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 с.
- Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- Удалить надосадочную жидкость.
- Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 с.
- Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- Удалить надосадочную жидкость.
- Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 с.
- Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- Удалить надосадочную жидкость.
- Открыть крышку пробирки и термостатировать пробирку при 50 °С в течении 5 мин .
- Добавить к осадку 400 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 5-10 с.
- Термостатировать пробирку при 50 °С в течение 5 мин .
- Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин. Если образец предполагается хранить, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

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

Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- Промаркировать стрипы для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца («К+») и отрицательного контрольного образца («К-») с помощью лабораторного маркера.

Примечание: комплекты реагентов серии Фемофлор снабжены цветовой кодировкой (см. табл. 1), которая позволяет определить первую пробирку каждого теста и различать стрипы между собой в Фемофлоре 16. При использовании набора Фемофлор 16 для исследования одного образца необходимо промаркировать по два стрипа (стрип-1, стрип-2). Стрип-1 и стрип-2 в исследовании для удобства сотрудников лаборатории помечены различным цветом парафина и буфера, что позволяет визуально отличить их друг от друга. Первая пробирка каждого стрипа также помечена цветом буфера или парафина (см. табл. 1).

При использовании набора Фемофлор 8 для исследования одного образца необходимо промаркировать один стрип. Первая пробирка стрипа помечена голубым цветом буфера (см. табл. 1).

При использовании набора Фемофлор 4 один стрип рассчитан на исследование двух образцов. Первая пробирка каждого исследования (1 и 5, соответственно) помечена голубым цветом буфера (см. табл. 1).

- Открыть крышки стрипов.
- Раствор Taq-полимеразы тщательно перемешать путем встряхивания на вортексе.

Добавить в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл перемешанного раствора Taq-полимеразы.

- Добавить в каждую пробирку по 1 капле минерального масла. Закрыть крышки стрипов.
- Перенести пробирки в зону пробоподготовки.
- Открыть крышки стрипов, в которые будет вноситься данный образец.
- Добавить в каждую пробирку стрипа, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме стрипов «К-», «К+»).
- В стрипы, маркированные «К-», добавить 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку.
- В стрипы, маркированные «К+», добавить 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- Закрыть крышки стрипов после внесения образца.
- Центрифугировать стрипы на вортексе в специальном штативе, предназначенном для стрипов, при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

Создание тестов «Фемофлор» для детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

Тесты Фемофлор для программы «ДТ-96» предоставляются производителем набора (файл Фемофлор.ini).

Файл с тестами Фемофлор.ini следует загружать открыв программу ДТ-96 (в меню: Работа с прибором/Тест/Добавить группу тестов из файла). Файл Фемофлор.ini содержит автоматические настройки, указанные в Приложении 1.

Создание протокола и амплификация

Для запуска программы амплификации на приборе ДТ необходимо сделать следующее:

- нажать кнопку «Работа с прибором»;
- в появившемся окне «Список приборов» выбрать подключенный прибор, нажать кнопку «Подключить»;
- нажать кнопку «Добавить тест»;
- выбрать в списке «Тест» название используемого набора реагентов — Фемофлор-16/ Фемофлор-8/ Фемофлор-4 (рис.1);
- указать нужное количество образцов, в качестве примера взято 4 образца, (рис. 2);
- выбрать параметр «Вертикальное заполнение плашки» (рис. 2);
- Необходимо установить пробирки в прибор в соответствии со схемой расположения пробирок в программе.
- Заполнить идентификаторы образцов, для этого в поле «Идентификатор» вместо «образец_1», «образец_2» и далее необходимо ввести идентификатор соответствующей пробы (либо фамилию пациентки, либо номер пробы). Наименование положительного и отрицательного контрольных образцов также указывается в поле идентификатора соответствующей пробы.

Рис. 1. Выбор теста в зависимости от используемой комплектации набора.

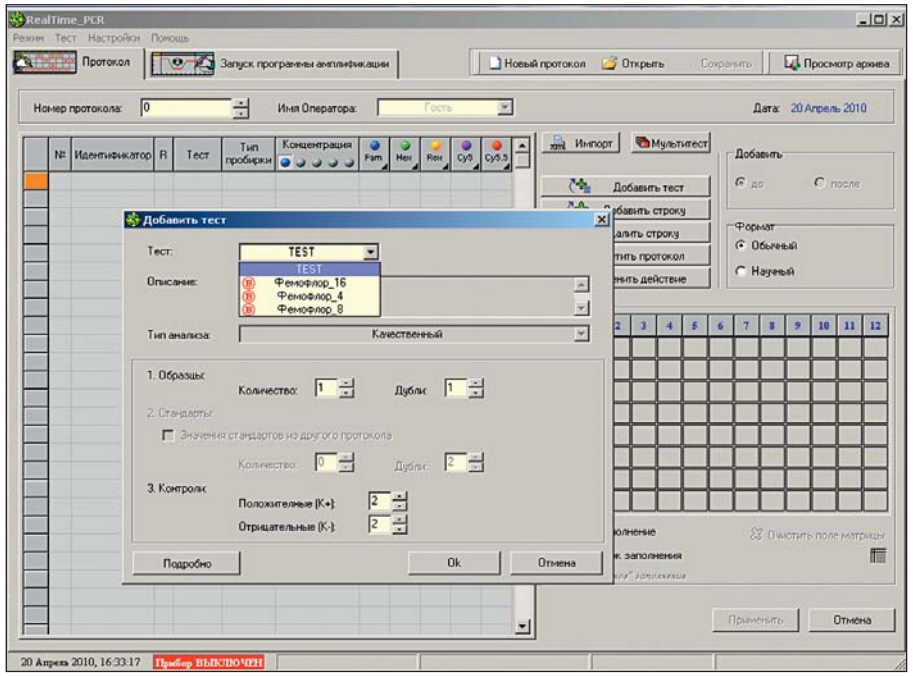
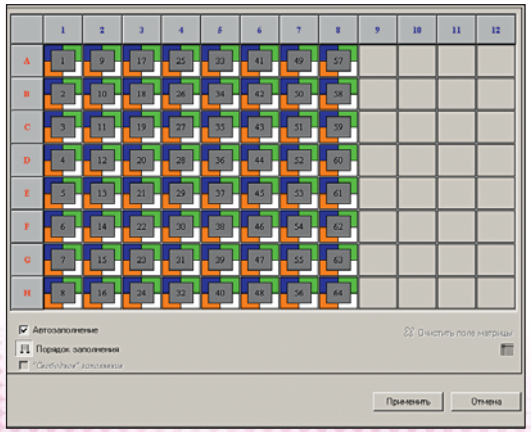


Рис. 2 Пример заполнения плашки.



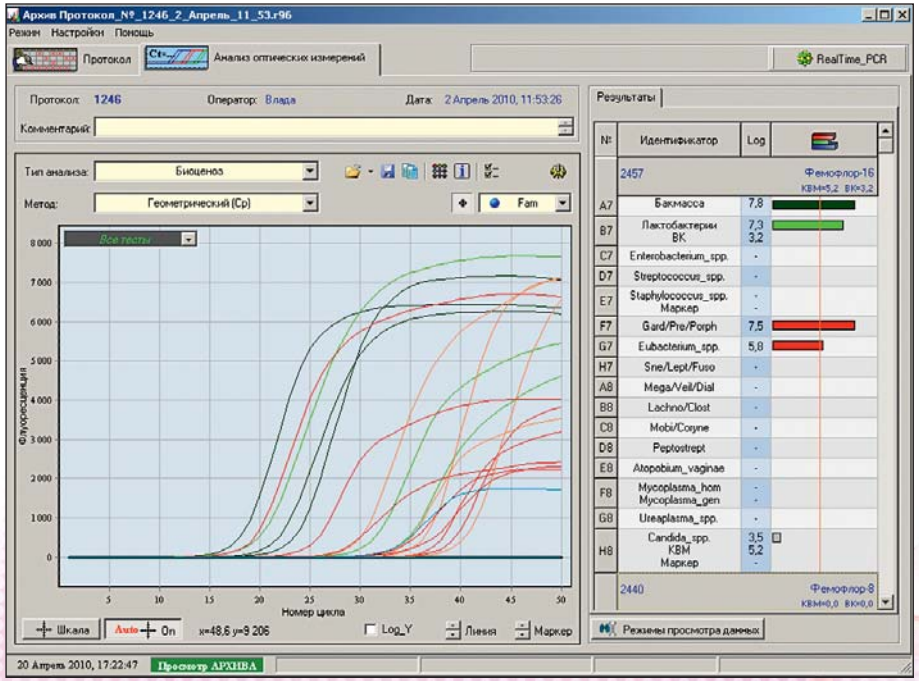
- Нажать кнопку «Применить», после чего программа перейдет в закладку «Запуск программы амплификации»
- Нажать кнопку «Запуск программы», в появившемся окне ввести имя файла, в который будут сохраняться результаты амплификации (по умолчанию программа предлагает названия файлов Протокол№_Номер_День_Месяц_Время запуска), рекомендуется добавить в имя файла название теста — Фемофлор, для облегчения последующей работы с архивом результатов.
- Нажать кнопку «Сохранить», после этого программа амплификации будет загружена в прибор и на экране появится окно Выполнение программы амплификации.

Регистрация результатов амплификации

Детекция и учет результатов осуществляется на детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») или аналогичном оборудовании в соответствии с инструкцией к прибору.

После завершения амплификации на экране появится окно с надписью «Программа завершила свое выполнение и оператор может перейти к анализу оптических измерений». Необходимо нажать кнопку «Ок», после этого появится окно «Анализ оптических измерений» (рис. 3).

Рис. 3. Окно «Анализ оптических измерений».



Учет результатов реакции

Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором ДТ-96.

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

При наличии в исследуемом образце ДНК микроорганизмов, выявляемых набором Фемофлор данной комплектации, в строке с названием микроорганизма указана цифра, обозначающая количество микроорганизма (в логарифмическом масштабе), и гистограмма, в графическом виде отображающая количество данного микроорганизма и его соотношение с другими микроорганизмами.

В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ) и внутреннего контроля (ВК).

Значение КВМ меньше 4 следует интерпретировать как недостаточное количество материала. В этом случае может потребоваться повторное взятие клинического материала.

Если значение ВК меньше 3,5, то результаты теста считаются недостоверными из-за ингибирования реакции. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

В положительных контрольных образцах количество микроорганизмов (в логарифмическом масштабе) должно быть больше 4. При получении значений ниже 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

В отрицательных контрольных образцах количество микроорганизмов не должны превышать значений, указанных в Таблице 2. При получении значений превышающих значения, указанные в таблице 2, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 2. Количество микроорганизмов, определяемых в отрицательном контрольном образце

Фемофлор 16		
№	Название микроорганизма	Количество в К-,Lg
1	Общая бактериальная масса	не более 3,5
2	Lactobacillus spp.	не более 2,5
3	Сем. Enterobacteriaceae	не более 2,5
4	Streptococcus spp.	не более 2,5
5	Staphylococcus spp.	не более 2,5
6	Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porhyromonas spp.	не более 2,5
7	Eubacterium spp.	не более 2,5
8	Sneathia spp./Leptotrihia spp./ Fusobacterium spp.	не более 2,5
9	Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.	не более 2,5
10	Lachnobacterium spp./Clostridium spp.	не более 2,5
11	Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.	не более 2,5
12	Peptostreptococcus spp.	не более 2,5
13	Atopobium vaginae	Отсутствует
14	Mycoplasma (hominis +genitalium)	Отсутствует
15	Ureaplasma (urealyticum + parvum)	Отсутствует
16	Candida spp.	не более 3,0
17	Контроль взятия материала	Отсутствует
Фемофлор 8		
№	Название микроорганизма	Количество в К-, Lg
1	Общая бактериальная масса	не более 3,5
2	Lactobacillus spp.	не более 2,5
3	Сем. Enterobacteriaceae	не более 2,5
4	Streptococcus spp.	не более 2,5
5	Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porhyromonas spp.	не более 2,5
6	Eubacterium spp.	не более 2,5
7	Mycoplasma hominis	Отсутствует
8	Candida spp.	не более 3,0
9	Контроль взятия материала	Отсутствует
Фемофлор 4		
№	Название микроорганизма	Количество в К-, Lg
1	Общая бактериальная масса	не более 3,5
2	Lactobacillus spp.	не более 2,5
3	Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porhyromonas spp.	не более 2,5
4	Candida spp.	не более 3,0
5	Контроль взятия материала	Отсутствует

Анализ полученных результатов

При анализе полученных результатов ПО прибора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») автоматически рассчитывает и выдает бланк.

Для того, чтобы получить **Специализированный отчет** по результатам анализа условно-патогенной флоры по окончании амплификации необходимо нажать кнопку (Показывать инструментальную панель) и выбрать пункт меню (специализированный отчет по биоценозам), нажав на значок .

При появлении бланка выдачи результатов врач-лаборант может внести информацию о лаборатории, организации и враче, направившем биоматериал на анализ, а также внести сведения о пациенте (ФИО, возраст, внести примечания).

Для этого необходимо в специализированном отчете по биоценозам нажать кнопку и внести информацию о полученном образце (рис.4).

Рис. 4. Информационные поля для заполнения.

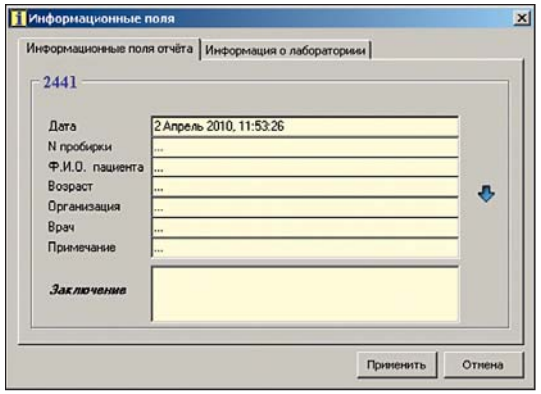
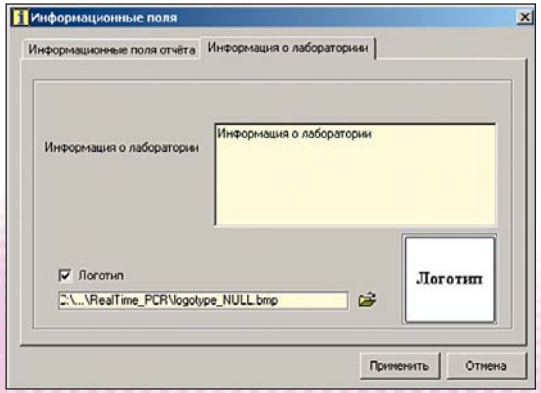


Рис. 5. Информация о лаборатории.



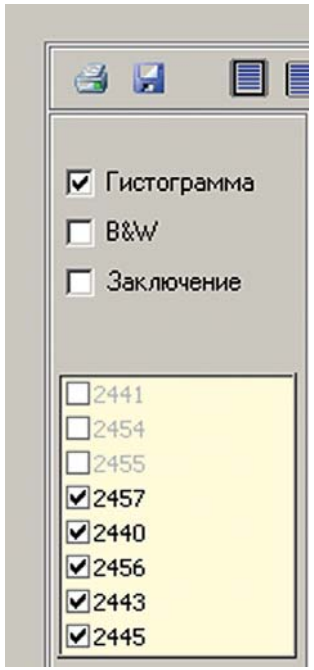
ПО позволяет вносить информацию о лаборатории, проводившей анализ:

адрес и телефон лаборатории, название проведенного исследования, логотип лаборатории (рис.5).

После заполнения информационных полей необходимо нажать кнопку . Внесенная информация будет сохранена автоматически.

При установке значка ✓ Гистограмма напротив пункта Гистограмма в специализированном отчете появляется Рисунок гистограммы под таблицей с результатом образца (Рис. 6). Аналогичным образом можно выводить лабораторное заключение в бланк выдачи результатов.

Рис. 6. Настройка специализированного отчета по биоценозам



При установке значка ✓напротив пункта B&W отчет становится черно-белым и пригоден к печати на черно-белом принтере.

В окне, соответствующем номеру образца можно выбрать все образцы для распечатывания отчета или несколько интересующих или один образец. Отчет будет сформирован по тем образцам, которые были выбраны.

ПО предполагает сохранение результатов исследования (специализированных отчетов по биоценозам) в виде файлов с расширениями: *.rtf MS Word, *.pdf Acrobat Reader, *.jpg, *html (кнопка).

Если необходимо проанализировать уже сделанные тесты Биоценозов, то при загрузке программы необходимо войти в меню Просмотр архива, загрузить уже сделанный протокол и, выбрав пункт меню (Изменить параметры анализа), нажать кнопку Дополнительные настройки анализа, войти в дополнительные настройки анализа и повторить вышеописанную процедуру

Справа наверху бланка лаборатория, проводившая анализ, указывает следующую информацию: Адрес и телефон лаборатории, название проведенного исследования, логотип лаборатории.

В верхнем левом углу бланка помещается информация о пациенте, учреждении, направившем его на анализ, а также вносится внутренний идентификационный номер пробирки, в которой проходил анализ (рис.7):

Рис. 7. Пример заполнения информационных полей.

Дата	
№ пробирки	14088
Ф.И.О. пациента	Иванова Лариса Ивановна
Возраст	25 лет
Организация	Поликлиника № 1
Врач	Сидоров Петр Петрович
Примечание	В пробирке была кровь

Идентификатор образца: 011

В основной части бланка выдачи результата анализа располагаются следующие показатели:

1. № пробирки (столбец **№**)

2. Перечень проведенных исследований (контроль взятия материала и выявление ДНК условно-патогенных микроорганизмов методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени) (столбец **Название исследования**)

3. ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени позволяет определить количество ДНК искомого микроорганизма в образце, которое принято выражать в геном-эквивалентах (ГЭ). Количество геном-эквивалентов пропорционально количеству клеток микроорганизма. Абсолютное количество геном-эквивалентов в образце приводится в первом столбце бланка результатов (столбец **Результаты Абсолютный**).

4. Результаты многочисленных исследований показали, что большое значение имеет не абсолютное количество микроорганизмов, а соотношение численности различных групп. В ходе анализа рассчитывается относительное количество соответствующей группы микроорганизмов в общей бактериальной массе. Относительное количество представлено в двух форматах: десятичный логарифм отношения количества соответствующей группы микроорганизмов к общей бактериальной и в процентах (столбец **Результаты Относительный (LgX/BM)**) (если установлен относительный тип анализа).

Справа от таблицы результатов количество ГЭ соответствующей группы микроорганизмов представлено в виде линейчатой диаграммы с логарифмической шкалой. На верхней оси обозначены количества микроорганизмов, соответствующие 0,01% 1% и 100% ОБМ. В случае, если доля группы микроорганизмов превышает 1%, соответствующий столбик на диаграмме выделяется цветом.

Каждый тип микроорганизмов на диаграмме окрашивается своим цветом:

- — общая бактериальная масса;
- — лактобактерии;
- — факультативно-анаэробные микроорганизмы;
- — облигатно-анаэробные микроорганизмы;
- — микоплазмы;
- — дрожжеподобные грибы.

Для удобства трактовки результатов в таблице используются цветовые маркеры в виде окрашенных квадратиков. В зависимости от измеряемого параметра маркеры обозначают следующее:

Контроль взятия материала

- — количество клеток человеческого эпителия в исследуемом образце более 10^4 ГЭ/образец: достаточное для анализа количество биоматериала
- — количество клеток человеческого эпителия в исследуемом образце менее 10^4 ГЭ/ образец: **НЕ достаточное** для анализа количество биоматериала

ОБМ

- — 10^6 — 10^9 ГЭ/ образец: нормальное значение ОБМ
- — менее 10^6 ГЭ/ образец: общая бактериальная обсемененность влагалища низкая

Нормофлора

- — нормоценоз -0,1 lg (доля лактобактерий относительно общей бактериальной массы более 80%)
- — умеренный дисбиоз -0,7 -0,1 lg (доля лактобактерий от 20 до 80%)
- — выраженный дисбиоз более -0,7 lg (доля лактобактерий относительно общей бактериальной массы менее 20%)

Факультативно- и облигатно-анаэробные микроорганизмы

- — доля микроорганизма в ОБМ -2 lg (менее 1%)
- — доля микроорганизма в ОБМ -2 lg до -1 lg (от 1% до 10%)
- — доля микроорганизмов в ОБМ от -1 lg до -0,4 lg (от 10% до 40%)
- — доля микроорганизма в ОБМ более - 0,4 lg (более 40%)

Микоплазма хоминис
☐ — микроорганизм не обнаружен
🟨 — от 0 до 10^3 ГЭ/образец — незначительное количество
🟥 — более 10^3 ГЭ/образец — значительное количество

Уреаплазма
☐ — микроорганизм не обнаружен
🟨 — от 0 до 10^4 ГЭ/образец — незначительное количество
🟥 — более 10^4 ГЭ/образец — значительное количество

Дрожжеподобные грибы
☐ — количество грибов ниже порога чувствительности метода ($10^{2,5}$ ГЭ/образец)
🟨 — $10^{2,5}$–$10^{3,5}$ ГЭ/образец — количество дрожжеподобных грибов незначительно повышено
🟥 — более $10^{3,5}$ ГЭ/образец — количество дрожжеподобных грибов значительно п вышено

Патогенные микроорганизмы (Mycoplasma genitalium)
☐ — микроорганизм НЕ выявлены
🟥 — микроорганизм обнаружены

5. Флаги и границы (столбец <- ->)

Таблица 3. Обозначения в столбце <- -> для нормофлоры

x - - [-]	Лактобактерии в образце не выявлены
- x - [-]	Количество лактобактерий относительно общей бактериальной массы (**ОБМ**) менее 20%
- - x [-]	Количество лактобактерий относительно **ОБМ** от 20 до 80%
- - - [x]	Количество лактобактерий относительно **ОБМ** от 80 до 100%

Таблица 4. Обозначения в столбце <- -> для условно-патогенной флоры*

[x - -] - -	Условно-патогенная флора в образце не выявлена
[- x -] - -	Количество условно-патогенной флоры относительно **ОБМ** не более 1%
[- - x] - -	Количество условно-патогенной флоры относительно **ОБМ** не более 10%
[- - -] x -	Количество условно-патогенной флоры относительно **ОБМ** не более 60%
[- - -] – x	Количество условно-патогенной флоры относительно **ОБМ** более 60%

* Эти цифры и границы зависят от тех установок, которые сделаны в лаборатории либо по умолчанию (то, что рекомендует ЗАО «НПФ ДНК-Технология», как разработчик), либо они могут быть изменены в зависимости от рекомендаций врача (в зависимости от цели исследования или в зависимости от группы пациентов).

При назначении в настройках программы абсолютного анализа (для таких микроорганизмов, как ***Mycoplasma hominis, Ureaplasma (urealyticum + parvum) и Candida spp.)*** под таблицей в качестве напоминания предусмотрена сноска * **Абсолютный анализ**. Для анализа *Mycoplasma genitalium* применяется **Качественный анализ**.

В самом низу бланка располагается поле «Заключение», заполняемое лабораторией при нажатии кнопки , дата и подпись сотрудника, выполнившего исследование.

Заключение

Исследование выполнил
Дата
Подпись

АЛГОРИТМ ФОРМИРОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Клиническое значение исследования биоценоза урогенитального тракта заключается в определении общего количества микроорганизмов и соотношении различных групп условно-патогенных микроорганизмов и нормофлоры. Биоценоз урогенитального тракта женщины является сложной системой, составляющей единое целое с эпителиальными клетками, и зависит от множества внутренних и внешних факторов, таких как:

1. гормональный статус;
2. возраст;
3. фаза цикла;
4. иммунный статус;
5. способы контрацепции;
6. сексуальная активность;
7. смена полового партнера;
8. прием лекарственных препаратов
9. и т.д.

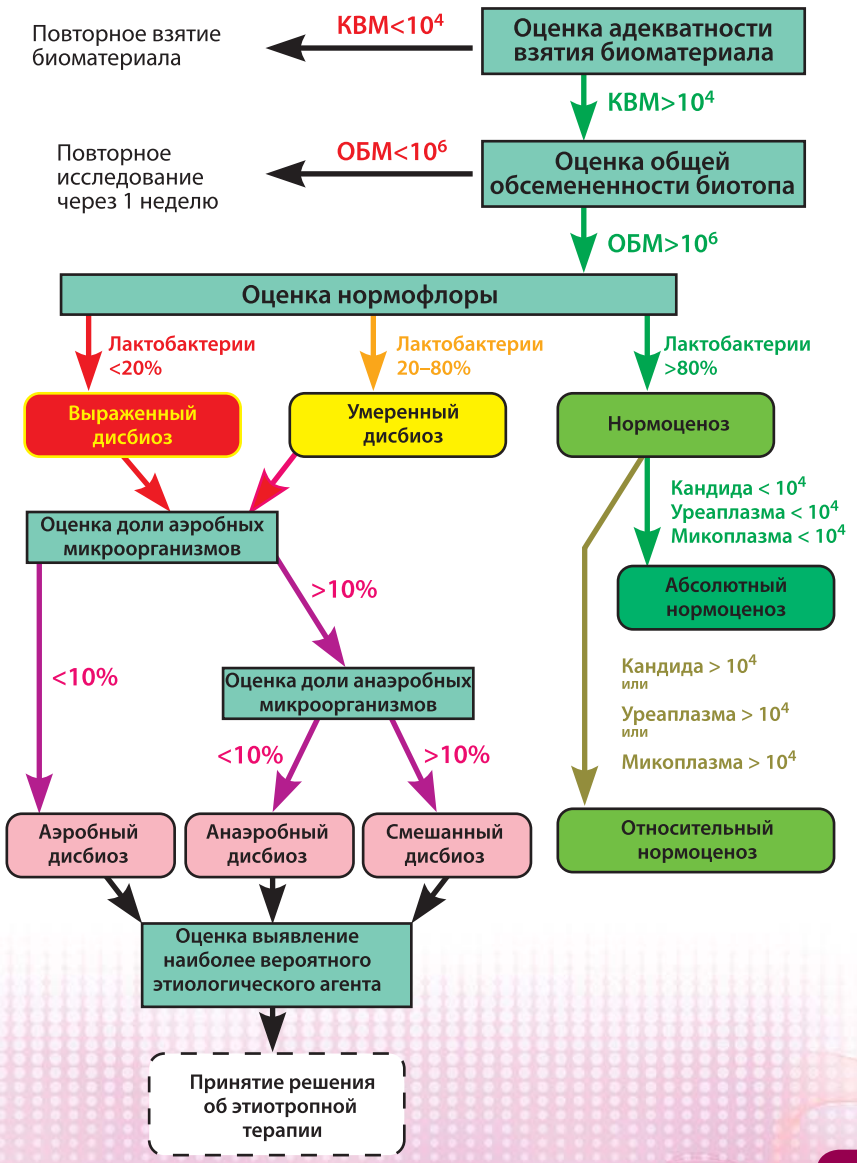
При исследовании биоценоза урогенитального тракта женщин врачу-клиницисту необходимо учитывать следующие параметры:

- клиническую картину;
- состояние репродуктивной системы;
- контроль взятия материала;
- **качественный состав микробиоты**
  - присутствие безусловных патогенов;
  - видовое разнообразие биоценоза;
- **количественный состав различных групп микроорганизмов**
  - общую бактериальную массу;
  - долю нормофлоры;
- долю в общей бактериальной массе основных групп условно-патогенных микроорганизмов.

Алгоритм формирования лабораторного заключения приведен на схеме 1.

Данный алгоритм применим только для оценки отделяемого влагалища женщин репродуктивного возраста.

Схема 1. Алгоритм формирования заключения для женщин репродуктивного возраста (вагина).



Контроль взятия материала:

значение контроля взятия биоматериала должно быть не менее 10^4. В случае низкого уровня КВМ полученные результаты не отражают истинного соотношения различных групп микроорганизмов и биоматериал должен быть взят повторно.

Оценка общей обсемененности биотопа (ОБМ)

Общая бактериальная масса - показатель, по которому можно судить об общем количестве бактерий в исследуемой пробе. Показатель оценивается в абсолютных значениях. Для вагинальных соскобов у здоровых женщин репродуктивного возраста эта величина составляет 10^6 — 10^8 (Анкирская А.С., Муравьева В.В., 2006). Величина ОБМ большая, чем 10^8, свидетельствует об избыточной микробной обсемененности исследуемого биоматериала. Величина показателя ОБМ меньшая, чем 10^5 соответствует сниженному количеству микроорганизмов в исследуемом образце.

У женщин репродуктивного возраста снижение общей бактериальной массы менее 10^6 ГЭ/образец чаще всего является следствием применения АБП. Рекомендуется повторить анализ не ранее, чем через 1 неделю.

Снижение этого показателя ниже $10^{5,5}$ ГЭ/образец у женщин в постменопаузе может являться следствием атрофических процессов.

Оценка нормофлоры

Основным представителем нормофлоры урогенитального тракта у здоровых женщин репродуктивного возраста являются представители рода Lactobacillus (ЛБ). На долю H_2O_2 продуцирующих лактобацилл приходится от 80 до 100% всех микроорганизмов (Nugent at al, 1991, Тихомиров А.Л., Олейник Ч.Г., 2004).

В результате анализа проводится количественная оценка биоты в абсолютных значениях, а также сравнивается количество нормобиоты и общая бактериальная масса и устанавливается разница порядков между ними. В норме абсолютное количество лактобацилл практически не отличается от общего количества бактерий, то есть составляет 10^6—10^8 (Анкирская А.С., Муравьева В.В., 2006).

Большое значение имеет соотношение количества лактобактерий и условно-патогенных групп микроорганизмов. Для женщин репродуктивного возраста доля лактобактерий среди выявленных микроорганизмов должна составлять не менее 95% всей бактериальной массы. Снижение доли лактобактерий ниже 80% говорит об умеренном, а ниже 20% - о выраженном дисбиозе.

В случае нормоценоза необходимо оценить абсолютное количество микоплазм и грибов.

В случае существенного снижения доли нормофлоры (<80%) необходимо определить — какие группы микроорганизмов доминируют в биоценозе. В случае увеличения доли факультативно-анаэробных микроорганизмов более 10% данный дисбиоз оценивается как аэробный. При увеличении доли облигатно-анаэробных микроорганизмов более 10% дисбиоз оценивается как анаэробный. Повышение обоих групп микроорганизмов расценивается как смешанный (аэробно-анаэробный дисбиоз).

Сравнение доли различных микроорганизмов позволяет сделать предположение об их этиологической роли в формировании дисбиотических изменений.

Исследование аэробной и анаэробной условно-патогенной микрофлоры

Из огромного количества разнообразных микроорганизмов, которые находятся в урогенитальном тракте женщин и мужчин, очень редкие из них действительно вызывают заболевание. К патогенным микроорганизмам, при выявлении которых обязательно назначается этиотропная терапия, относят такие как ***Treponema pallidum, Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus ducrei, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, а также простейшее Trichomonas vaginalis*** (Савичева А.М., 2008).

Количественный уровень аэробной и анаэробной условно-патогенной микрофлоры можно оценить как в абсолютных, так и относительных значениях. Абсолютные количества соответствуют показателям при бактериологических исследованиях.

Относительное количество того или иного микроорганизма вычисляется по отношению к количеству ОБМ, по разнице между Lg общей бактериальной массы и Lg конкретного микроорганизма аналогично тому, как вычисляется относительное количество самих лактобацилл по отношению к общему количеству бактерий (ОБМ).

Наборы реагентов «Фемофлор» (производства ООО «НПО ДНК-Технология») позволяют определять количественные соотношения большого спектра условно-патогенных микроорганизмов с ОБМ.

Исследование микоплазм и грибов рода Candida

Количественную оценку уровня микоуреаплазм (***Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum и parvum***), а также дрожжеподобных грибов рода ***Candida***, проводят только по абсолютному количеству.

Состав условно-патогенных микроорганизмов и их количественное соотношение в биоценозе может меняться от состояния нормоценоза до дисбиоза разной степени выраженности.

Условия хранения и эксплуатации набора

Срок годности набора — 6 мес.

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

Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Предлагаемый способ исследования урогенитального биоценоза у женщин показан для:

- оценки качественного и количественного состава микроорганизмов, образующих биоценоз урогенитального тракта;
- определения этиологической причины инфекционного процесса, что делает возможным осуществление направленной этиологической терапии;
- определения степени выраженности дисбиотических нарушений, в результате чего становится возможной индивидуализация объема терапии;
- оценки эффективности проводимой терапии и результатов лечения;
- мониторинга восстановления нормальной микрофлоры;
- контроля проведения ГЗТ.

Этапность наблюдения

Рекомендуется исследование биоценоза до начала проведения терапии.

После окончания приема АБП рекомендуется повторное исследование не ранее чем через 1 месяц.

Мониторинг течения беременности и контроль восстановления биоценоза после родов осуществляется по усмотрению лечащего врача.

В случае умеренного дисбаланса условно-патогенной флоры (в случае принятия врачом решения о нецелесообразности терапии) рекомендуется динамическое наблюдение.

Противопоказаний к применению метода нет.

В дополнение к настоящему методу, который позволяет определить этиологическую причину инфекционного процесса вызванного условно-патогенной биотой, рекомендуется:

- использование метода световой микроскопии для лабораторного подтверждения местной воспалительной реакции,
- качественное ПЦР исследование возбудителей урогенитальных инфекций, передаваемых половым путем (***Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae и Trichomonas vaginalis***).

Для уточнения этиологического диагноза необходимо учитывать результаты качественного анализа безусловных патогенов (хламидия, гонорея, трихомонас) методом ПЦР.

Для индивидуального подбора терапии рекомендуется определение чувствительности к АБП выявленных в биоценозе микроорганизмов.

---

1. Анкирская А.С., Муравьева В.В., Опыт микробиологической диагностики оппортунистических инфекций влагалища. Акушерство и гинекология. 2006.
2. Липова Е.В., Болдырева М.Н., Трофимов Д.Ю., Витвицкая Ю.Г. Урогенитальные инфекции, обусловленные условно-патогенной биотой у женщин репродуктивного возраста (Клинико-лабораторная диагностика). Пособие для врачей, Москва, 30с. 2009.
3. Приказ МЗ СССР №1030 от 4 октября 1980 г. Об утверждении форм первичной медицинской документации учреждений здравоохранения.
4. Савичева А.М. Лабораторная диагностика и терапия репродуктивно значимых инфекций. Лечащий врач, №3, 2008 г.
5. Тихомиров А.Л., Олейник Ч.Г. Гинекология, т.2, 2004. Бактериальный вагиноз: некоторые аспекты этиологии, патогенеза, клиники, диагностики и лечения.
6. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol. 1991 Feb;29(2):297-301.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПАРАМЕТРЫ ТЕСТОВ «ФЕМОФЛОР-4», «ФЕМОФЛОР-8», «ФЕМОФЛОР-16»

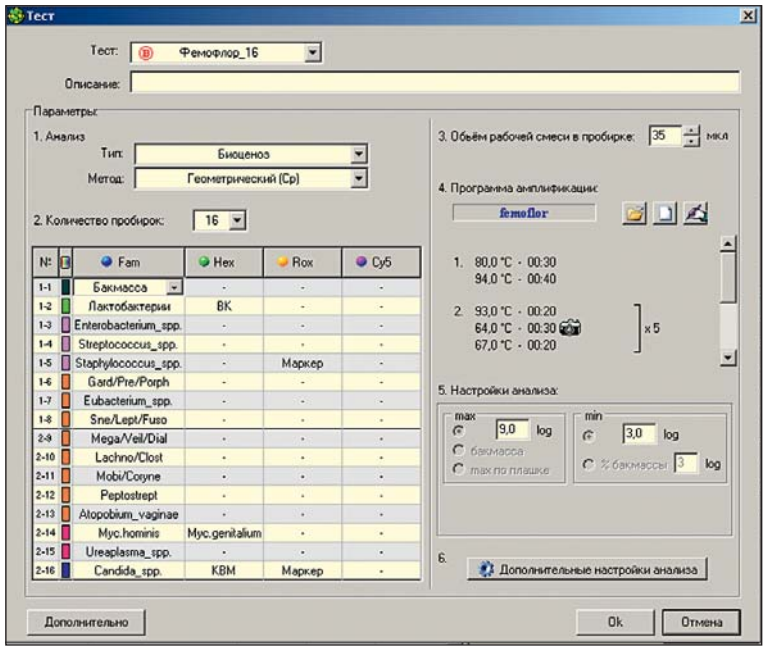
1. Анализ
Тип «Биоценоз»,
Метод «Геометрический (Ср)»,
2. Количество пробирок:
«4» (Фемофлор-4) / «8» (Фемофлор-8), / «16» (Фемофлор-16).
3. Критерий положительного результата ПЦР - 80%.
4. Объем рабочей смеси в пробирке «35 мкл»
5. Программа амплификации (см. табл. 2)
6. Настройки анализа
max «9,0» log, min «3,0» log, граница по лактобактериям (включена) «1,5» log.

Таблица 1. Программа амплификации

N блока	Температура	Время	Количество циклов
1	80 °C 94 °C	30 с 40 с	1
2	93 °C 64 °C * 67 °C	20 с 30 с 20 с	5
3	94 °C 64 °C * 67 °C	5 с 20 с 5 с	40
4	10 °C	Хранение	

*-регистрация результатов при данной температуре

Рис. 1. Дополнительные настройки анализа *



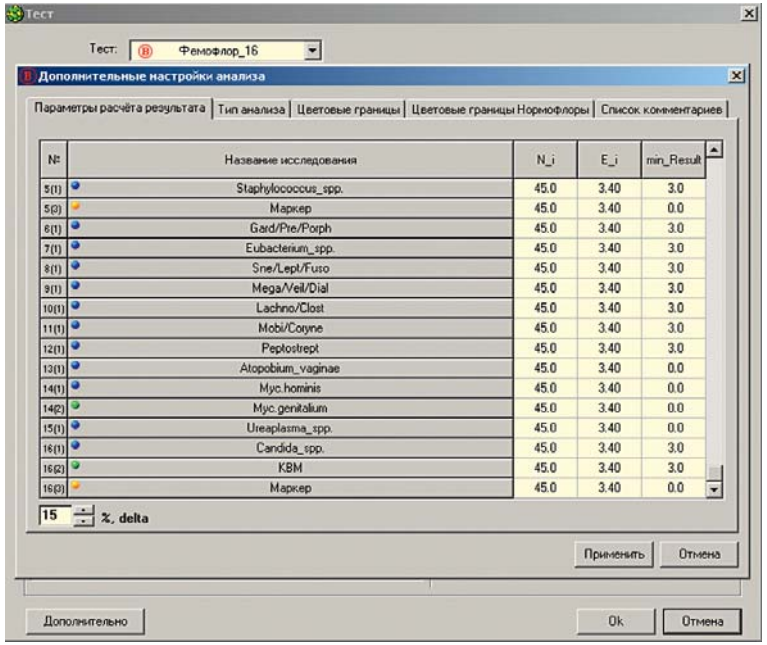
* Для версии программы не ниже версии 7.3.3

При нажатии клавиши Дополнительные настройки анализа появляется меню настроек анализа.

Вкладка меню «Параметры расчета результатов» относится к настройкам лабораторной части теста и характеризует параметры набора реагентов.

В меню «Параметры расчета результата» необходимо сделать следующие настройки (рис.2).

Рис. 2. Параметры расчета результатов



Кнопка предназначена для обозначения погрешности теста и установлена по умолчанию.

Остальные вкладки меню «Дополнительных настроек анализа» относятся к клинической интерпретации результатов и могут быть настроены по согласованию с врачами-клиницистами, направляющими в лабораторию материал на анализ.

Тип анализа

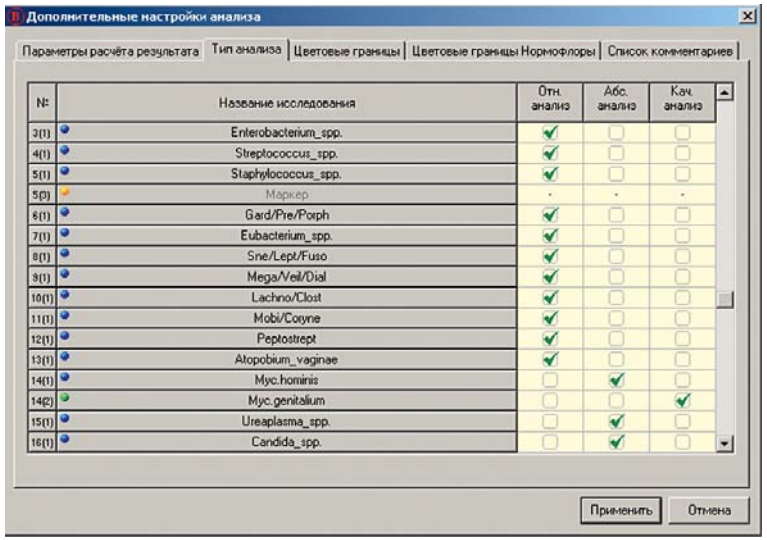
ПО позволяет изменять параметры анализа при исследовании биоценоза урогенитального тракта. Пункт меню «Тип анализа» позволяет выбрать относительный или абсолютный анализ для всех групп условно-патогенных микроорганизмов, а также настроить параметры относительного и абсолютного анализа (рис.3).

Абсолютный анализ проводится для всех показателей вне зависимости от настроек. При этом типе анализа оценивается абсолютное количество соответствующих микроорганизмов. При выборе относительного типа анализа оценивается доля соответствующего микроорганизма относительно общей бактериальной массы в процентах.

Внимание! Грибы рода кандида не относятся к бактериям и не входят в бактериальную массу. Выбор относительного типа анализа для этого теста не рекомендуется.

Для *Mycoplasma genitalium* рекомендован качественный анализ (результат выдается по принципу **ОБНАРУЖЕНО**/не выявлено).

Рис. 3. Параметры анализа. Относительный, абсолютный и качественный анализ.



ПО амплификатора с детекцией результатов в режиме реального времени ДТ-96 предусматривает изменение параметров относительного и абсолютного анализа для нормофлоры и условно-патогенных микроорганизмов. Для этого достаточно выбрать пункт «Дополнительные настройки анализа»/ «Цветовые границы», пункт «Относительный анализ». Кроме того, возможно менять цветовую кодировку выдаваемых результатов. Для этого достаточно выбрать соответствующий образец, кликнув на нем и изменить его цвет, пользуясь стандартными таблицами цветов.

По умолчанию (в файле Фемофлор.ini) установлены цветовые границы анализа, соответствующие клинической интерпретации результатов в критериях Нагента. На усмотрение врача-клинициста границы могут быть изменены.

Цветовые границы

Рис. 4. Относительный анализ.

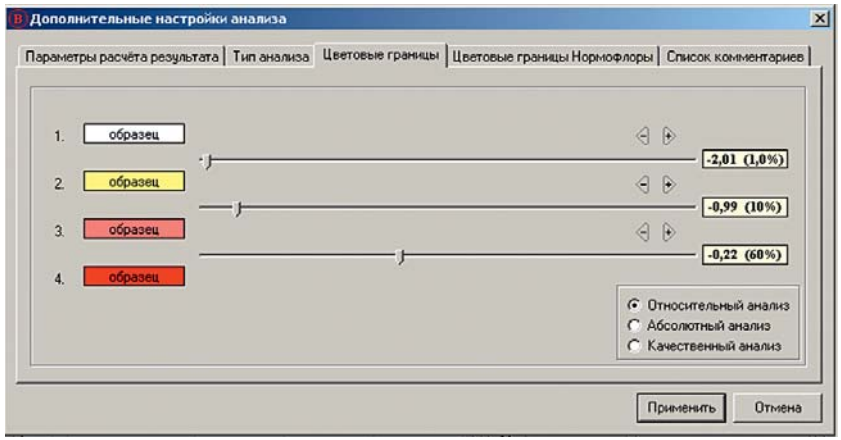


Рис. 5. Абсолютный анализ.

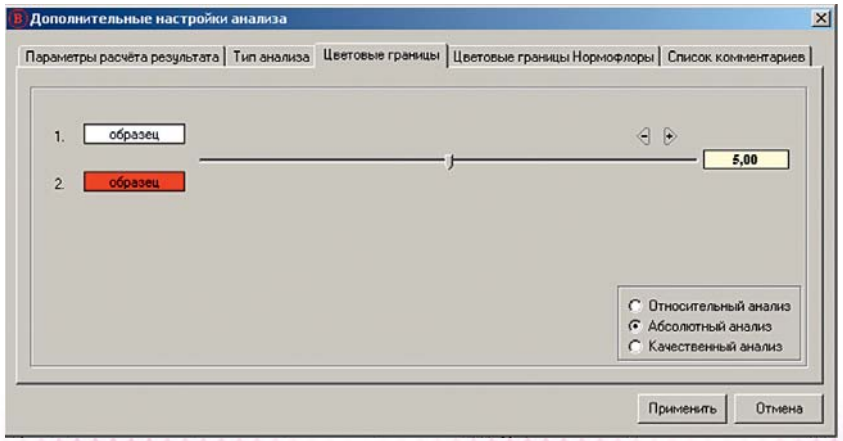
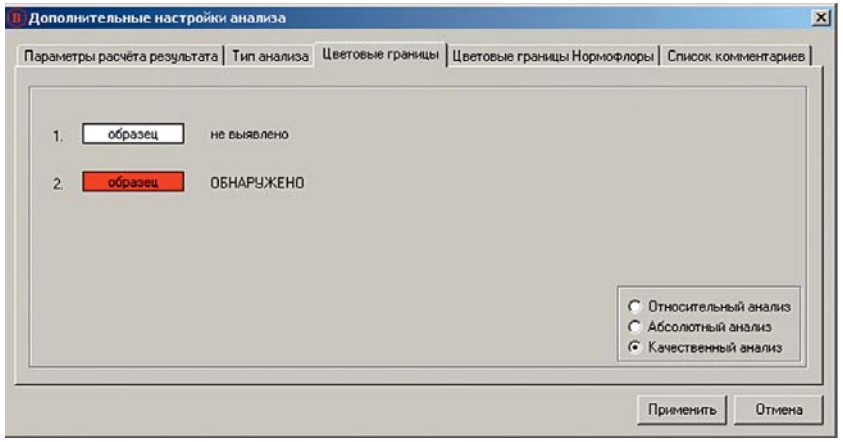
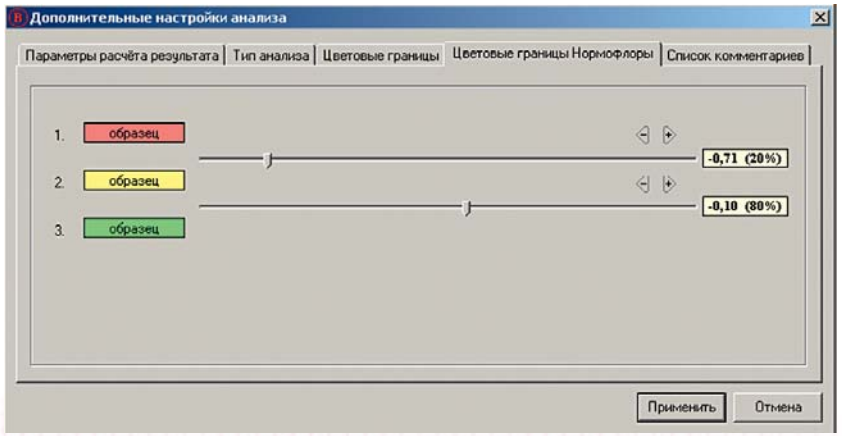


Рис. 6. Качественный анализ.



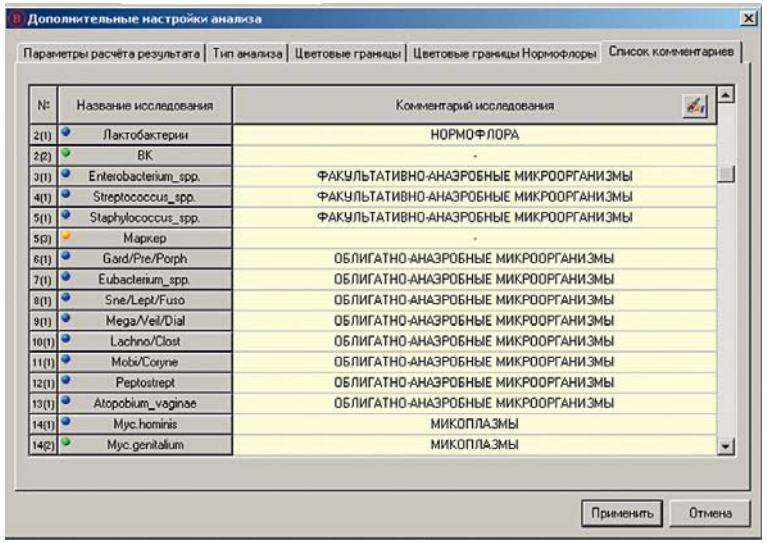
Цветовые границы Нормофлоры

Рис. 7. Цветовые границы Нормофлоры



Раздел список комментариев исследования позволяет выбрать тип анализируемого организма (Нормофлора, анаэробные микроорганизмы, анаэробные микроорганизмы и т.д.)

Рис. 8. Список комментариев исследования



Все сделанные настройки автоматически сохраняются ПО при нажатии клавиши Применить.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ПРИМЕРЫ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование биоценоза урогенитального тракта у женщин
Фемофлор-16

Логотип

Дата 5 Апрель 2010, 11:27:27
№ пробирки ...
Ф.И.О. пациента ...
Возраст ...
Организация ...
Врач ...
Примечание ...

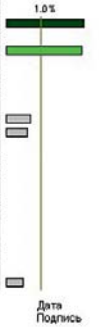
Информация о лаборатории

Идентификатор образца: 2458

№	Название исследования	РЕЗУЛЬТАТЫ		
		Абсолютный	Относительный Lg(X/БМ)	<- ->
	Контроль взятия материала	$10^{4.0}$		
1	Биомасса	$10^{6.7}$		
	НОРМОФЛОРА			
2	Лактобактерии	$10^{6.6}$	-0.1 (72-98%)	- - - [x]
	АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ			
3	Enterobacterium_spp.	не выявлено		
4	Streptococcus_spp.	не выявлено		
5	Staphylococcus_spp.	не выявлено		
6	Gard/Pre/Porph	$10^{4.2}$	-2.5 (0.3-0.4%)	[- x -] - -
7	Eubacterium_spp.	$10^{4.0}$	-2.7 (0.2-0.2%)	[- x -] - -
8	Sne/Lept/Fuso	не выявлено		
9	Mega/Veil/Dial	не выявлено		
10	Lachno/Clost	не выявлено		
11	Mobi/Coryne	не выявлено		
12	Peptostrept	не выявлено		
13	Atopobium_vaginae	не выявлено		
	ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ			
14	Candida_spp. *	не выявлено		
	МИКОПЛАЗМА			
15	Mycoplasma_hom *	не выявлено		
16	Ureaplasma_spp. *	$10^{3.8}$	3.8 (0.1-0.2%)	
	ПАТОГЕНЫ			
17	Mycoplasma_gen **	не выявлено		

* Абсолютный анализ Lg(X)
** Качественный анализ

№	Название исследования	Lg(X)
1	Биомасса	6.7
	НОРМОФЛОРА	
2	Лактобактерии	6.6
	АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ	
3	Enterobacterium_spp.	не выявлено
4	Streptococcus_spp.	не выявлено
5	Staphylococcus_spp.	не выявлено
6	Gard/Pre/Porph	4.2
7	Eubacterium_spp.	4.0
8	Sne/Lept/Fuso	не выявлено
9	Mega/Veil/Dial	не выявлено
10	Lachno/Clost	не выявлено
11	Mobi/Coryne	не выявлено
12	Peptostrept	не выявлено
13	Atopobium_vaginae	не выявлено
	ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ	
14	Candida_spp. *	не выявлено
	МИКОПЛАЗМА	
15	Mycoplasma_hom *	не выявлено
16	Ureaplasma_spp. *	3.8



Исследование выполнил:

Нормоценоз.

Исследование биоценоза урогенитального тракта у женщин
Фемофлор-16

Логотип

Дата 5 Апрель 2010, 11:27:27
№ пробирки ...
Ф.И.О. пациента ...
Возраст ...
Организация ...
Врач ...
Примечание ...

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: 2465

№	Название исследования	РЕЗУЛЬТАТЫ		
		Абсолютный	Относительный Lg(X/БМ)	<- ->
	Контроль взятия материала	$10^{5.9}$		
1	Биомасса	$10^{7.9}$		
	НОРМОФЛОРА			
2	Лактобактерии	$10^{4.8}$	-3.1 (<0.1%)	- x - [-]
	АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ			
3	Enterobacterium_spp.	не выявлено		
4	Streptococcus_spp.	не выявлено		
5	Staphylococcus_spp.	не выявлено		
6	Gard/Pre/Porph	$10^{6.9}$	-1.0 (9-12%)	[- - -] x -
7	Eubacterium_spp.	$10^{7.1}$	-0.8 (14-18%)	[- - -] x -
8	Sne/Lept/Fuso	$10^{6.6}$	-1.3 (4-6%)	[- - x] - -
9	Mega/Veil/Dial	$10^{6.3}$	-1.6 (2.3-3.1%)	[- - x] - -
10	Lachno/Clost	$10^{5.1}$	-2.8 (0.1-0.2%)	[- x -] - -
11	Mobi/Coryne	$10^{3.0}$	-4.9 (<0.1%)	[- x -] - -
12	Peptostrept	$10^{6.0}$	-1.9 (1.0-1.3%)	[- - x] - -
13	Atopobium_vaginae	$10^{7.4}$	-0.5 (29-39%)	[- - -] x -
	ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ			
14	Candida_spp. *	$10^{5.0}$	5.0 (0.1-0.1%)	
	МИКОПЛАЗМА			
15	Mycoplasma_hom *	не выявлено		
16	Ureaplasma_spp. *	не выявлено		
	ПАТОГЕНЫ			
17	Mycoplasma_gen **	не выявлено		

* Абсолютный анализ Lg(X)
** Качественный анализ

№	Название исследования	Lg(X)
1	Биомасса	7.9
	НОРМОФЛОРА	
2	Лактобактерии	4.8
	АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ	
3	Enterobacterium_spp.	не выявлено
4	Streptococcus_spp.	не выявлено
5	Staphylococcus_spp.	не выявлено
6	Gard/Pre/Porph	6.9
7	Eubacterium_spp.	7.1
8	Sne/Lept/Fuso	6.6
9	Mega/Veil/Dial	6.3
10	Lachno/Clost	5.1
11	Mobi/Coryne	3.0
12	Peptostrept	6.0
13	Atopobium_vaginae	7.4
	ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ	
14	Candida_spp. *	5.0
	МИКОПЛАЗМА	
15	Mycoplasma_hom *	не выявлено
16	Ureaplasma_spp. *	не выявлено

Исследование выполнил:

Выраженный анаэробный дисбиоз.

ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

117587, г. Москва
Варшавское шоссе
д. 125Ж, корп. 6

Тел.: (495)980-45-55