

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов для диагностики
бактериального вагиноза (определения концентрации ДНК
Gardnerella vaginalis, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и
общего количества бактерий) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
**«АмплиСенс[®] ФлороЦеноз / Бактериальный
вагиноз-FL»**

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ И ПРИНЦИП РАБОТЫ	4
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК	5
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).....	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай).	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ CFX96 и CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	20
РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	26
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	28

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
КС	- коэффициент соотношения
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО BV– ПКО BV+	- положительные контрольные образцы этапа экстракции
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ТСМ	- транспортная среда с муколитиком
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FC1, FC2	- ДНК-калибраторы
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ И ПРИНЦИП РАБОТЫ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» при диагностике бактериального вагиноза. Бактериальный вагиноз – это клинический симптомокомплекс, развивающийся в результате изменения экологии влагалища, когда нормальная микрофлора, представленная главным образом лактобациллами (*Lactobacillus* spp.), полностью или частично замещается преимущественно анаэробной микрофлорой. В настоящее время описано более 200 микроорганизмов (преимущественно анаэробных), обнаруживающихся при бактериальном вагинозе. Однако данные исследований последних лет показывают, что ключевую роль в развитии бактериального вагиноза играет *Gardnerella vaginalis*, так как:

- обнаруживается практически у всех пациенток с бактериальным вагинозом,
- обладает наибольшим патогенным потенциалом из других описанных ассоциантов,
- обладает выраженной способностью к адгезии,
- формирует биоплёнку,
- продуцирует факторы патогенности: цитолизин (вагинолизин), сиалидазу.

Другим значимым маркером бактериального вагиноза является *Atopobium vaginae*, микроорганизм, высокоспецифичный для данного синдрома. При этом *Atopobium vaginae* имеет повышенную устойчивость к метронидазолу, поэтому его обнаружение может потребовать изменения тактики терапии.

С учётом этого принцип диагностики бактериального вагиноза с использованием набора реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» основан на количественном определении и расчёте соотношений между ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий (Bacteria) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай);
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- CFX96, CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

Соответствие названий каналов для флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6GYellow/Cy3
канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служит вагинальный мазок (соскоб эпителиальных клеток боковых стенок влагалища, отделяемое влагалища). Получение материала следует проводить с помощью универсального зонда или зонда-тампона на пластиковой основе в пробирку объемом 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)» или «ТС-ЭДЭМ». Погрузить рабочую часть зонда в вагинальное отделяемое задненижнего свода влагалища и, вращая зонд, провести по поверхности эпителия, максимально полно набирая материал на зонд.

Перенести зонд в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить в области насечки и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Недостовверные результаты могут быть получены в следующих случаях:

- материал взят в недостаточном количестве или взятие материала произведено некачественно;
- материал получен из другого локуса (например, цервикального канала);
- женщине проводится антибактериальная терапия. В этом случае рекомендуется провести повторное исследование не ранее, чем через две недели после окончания терапии;
- материал получен от девочек, находящихся в препубертатном периоде (до наступления менархе) или от женщин, находящихся в менопаузе;
- для исследования предоставлен материал от мужчины.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

Для экстракции ДНК рекомендуется использование набора реагентов «ДНК-Сорб-АМ».

Процедура выделения ДНК

¹ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

1. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внести по 10 мкл ВКО-FL в случае исследования образцов с помощью наборов реагентов, в которых ВКО-FL используется в качестве экзогенного контроля.
2. Ресуспендировать сорбент и внести в каждую пробирку по 20 мкл сорбента универсального, после чего внести по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с фильтром.

Примечание – Если количество обрабатываемых клинических образцов составляет более 50 за рабочую смену, рекомендуется добавить весь объем сорбента и ВКО во флакон с лизирующим раствором (2 мл сорбента универсального и 1 мл ВКО на 30 мл лизирующего раствора). Полученную суспензию тщательно перемешать и внести по 330 мкл в подготовленные пробирки. Допускается хранение смеси не более 2 сут при комнатной температуре. Перед применением суспензию тщательно перемешать.

3. Внести по 100 мкл клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл транспортной среды с муколитиком (ТСМ). В пробирку положительного контроля экстракции (BV–) вносится 90 мкл транспортной среды с муколитиком (ТСМ) и 10 мкл ПКО BV–; в пробирку положительного контроля экстракции (BV+) вносится 90 мкл транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» и 10 мкл ПКО BV+.
4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при 65 °С в термостате. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин.
5. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс об/мин в течение 30 с. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
7. Повторить п. 5.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
9. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования

сорбента. Поместить в термостат с температурой 65 °С на 5 мин.

10.Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Полученные пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С. При повторном исследовании проб содержимое пробирок необходимо перемешать на вортексе и повторить п.10.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000/для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки в ротор амплификатора так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установить ротор в прибор, закрыть крышку (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе). Пробирки должны быть установлены в лунки ротора в следующем порядке: вначале исследуемые образцы, затем контрольные образцы (BV-) и (BV+), затем отрицательные контроли, затем ДНК-калибраторы – FC1, FC2.

ВНИМАНИЕ! Если ротор прибора заполнен не полностью, то его следует уравновесить. Для этого следует заполнить незанятые места пустыми пробирками (**не используйте пробирки от предыдущих экспериментов**). Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (***не пустой***).

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и отметить, что Вы не используете пробирки с выпуклыми крышками (Rotor-Gene 3000)/закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры амплификации.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
1 Cycling / Циклирова- ние	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
2 Cycling / Циклирова- ние	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс®» для выявления ДНК возбудителей ИППП и др. инфекций органов репродукции. Поэтому можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Примечание – Канал **Cy5.5/Crimson** включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

6. После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain**

Optimisation.../Опт.уровня сигн. В открывшемся окне:

- а) осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - б) установить калибровки всех каналов, указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал 5, Max Reading/Максим. Сигнал 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
 9. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
 10. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Названия контрольным образцам даются согласно инструкции к шаблону расчета результатов (программе) в формате Microsoft Excel.

11. Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

ВНИМАНИЕ! При установке типа **None/Пусто** данные образца анализироваться не будут.

Анализ результатов:

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green:

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**)

должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.

5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,05** (см. табл. 1).

Таблица 1

Канал флуоресценции	Детектируемый параметр	NTC Threshold/ Порог Фона	Threshold/ Порог	Slope Correct / Коррект. уклона
FAM/Green	ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i>	10-20 %	0,05	включена
JOE/Yellow	ДНК <i>Atopobium vaginae</i>	10-20 %	0,05	включена
ROX/Orange	ДНК <i>Lactobacillus</i> spp.	5-10 %	0,05	включена
Cy5/Red	ДНК Bacteria	10-30 %	0,05	включена

6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10-20 %** (см. табл. 1).
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct** для ДНК *Gardnerella vaginalis* в каждом исследуемом образце).

Анализ результатов реакции амплификации по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red:

Провести анализ результатов по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red аналогично пунктам 1-6 анализа канала FAM/Green, используя соответствующие значения из табл. 1.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай).

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через дно пробирки).

Запуск прибора и анализ результатов проводить при помощи программного обеспечения FRT Manager.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее 15 мин.

2. Запустить программу iCycler iQ/iQ5.
3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

ВНИМАНИЕ! Следить за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new** в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать соответствующие параметры амплификации. Дать название новому протоколу и сохранить его.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс®» для выявления ДНК возбудителей ИППП и др. инфекций органов репродукции. Поэтому можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

3. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.
4. В открывшемся окне все образцы обозначить как **Unknown**. Для всех образцов задать измерение флуоресценции по четырем каналам JOE/HEX, FAM, ROX и Cy5.
5. Задать объем реакции **Sample Volume – 25 мкл**.
6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора iCycler iQ5. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp.

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого в модуле **Workshop** нажать **Data file** и выбрать файл данных. Перейти в режим **Data Analysis**.
2. Просматривать данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно нажать кнопку **Log View** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца FC2 в последнем цикле амплификации».
4. Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant** и кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ CFX96 и CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне программы выбрать пункт **Create a new Run**. Назначить для выполнения универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1»:

Программа «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	---	1
2	95	5 с	---	5
	60	20 с	---	
	72	15 с	---	
3	95	5 с	---	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	---	

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» является универсальной для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс®» для выявления ДНК возбудителей ИППП и др. инфекций органов репродукции. Поэтому можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Примечание – Канал **Quasar705** включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

Для этого выбрать или создать эту программу в модуле **Experiment Setup** в окне **Protocol Editor**. Объем реакции **Sample Volume** задать равным 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.

1	95,0 C for 15:00
2	95,0 C for 0:05 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	60,0 C for 0:20 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0 C for 0:15 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 2 , 4 more times
6	95,0 C for 0:05 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7	60,0 C for 0:30 + Plate Read Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8	72,0 C for 0:15 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
9	GOTO 6 , 39 more times
	END

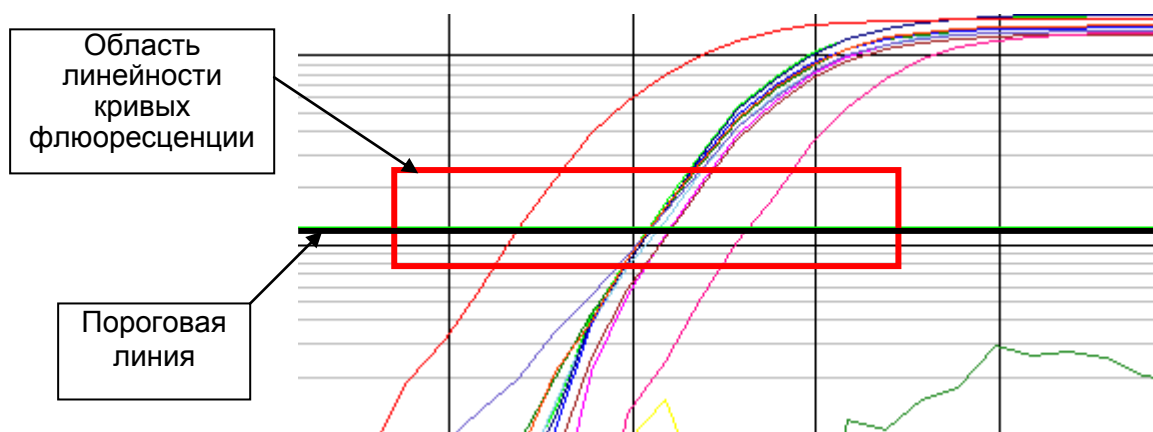
- В следующем окне (модуль **Plate**) задать схему планшета – указать расположение образцов в реакционном блоке и назначить детекцию флуоресценции по пяти каналам **FAM, HEX, ROX** и **Cy5** для всех образцов. Для этого с помощью кнопки **Select Fluorophores...** выбрать (отметить галочками) нужные флуорофоры в списке. Для всех проб в поле **Sample type** выбрать **Unknown**. Указать идентификаторы образцов в поле **Sample name**. Сохранить файл схемы планшета, нажать кнопку **OK**.
 - Открыть крышку прибора с помощью кнопки **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с заданной схемой планшета. Закрыть крышку прибора кнопкой **Close Lid**.
- ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.
- Запустить выполнение выбранной программы «**АмплиСенс-1**» с заданной схемой планшета, нажав кнопку **Start Run**.
 - После окончания выполнения программы амплификации и детекции можно приступить к анализу результатов.

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов

автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp.

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать файл данных.
2. Проанализировать данные отдельно по каждому каналу, выключив все остальные каналы (сняв галочку в боксе с обозначением канала под основным окном с графиками **Amplification**).
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно поставить галочку в окне **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца FC2 в последнем цикле амплификации».



4. В таблице результатов появятся значения пороговых циклов **Ct** для анализируемого канала.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору

реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.

Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** на верхней панели выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста – **BV** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – Пороговый (**Сt**);
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец** (включая клинические образцы, положительные контроли этапа экстракции ДНК (BV–), (BV+), ОК);
 - **Контроли** – положительные-4 (калибраторы FC1,FC2); отрицательные – 1 (К–);
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл;
 - **Флуорофоры** – Fam, Hex, Rox, Cy5 – специфика;
 - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	Fam, Hex, Rox, Cy5	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс®» для выявления ДНК возбудителей ИППП и др. инфекций органов репродукции. Поэтому можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Примечание – Канал Cy5.5 включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.


2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **BV**, указать количество образцов и нажать **ОК**.
4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации** указать **Объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

ВНИМАНИЕ! Необходимо следить за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.


7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями C_t калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus spp.*

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: C_t (Ср) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый C_t** .
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
 - **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**
 - **Критерии достоверности результата: поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 5 %**.
5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки Ф (отжать кнопку).**
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. При необходимости поочередно для каналов **Fam, Hex, Rox, Cy5** установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер.

Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого поставить галочку в окне **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца FC2 в последнем цикле амплификации».

Для дальнейшей работы с данными скопировать результаты значений C_t для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета в виде файла Word нажать кнопку **Отчет по результатам анализа** . Далее выбрать галочками параметры, необходимые для отображения в отчете, нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат **«*MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML»** и папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

К каждому набору реагентов прилагается вкладыш, в котором указаны концентрации ДНК-калибраторов, необходимых для расчета концентраций исследуемых проб, а также характеристики контрольных образцов.

Анализ результатов проводится с помощью шаблона расчета результатов (программы) в формате Microsoft® Excel согласно прилагаемой к ней инструкции. Алгоритм расчета, заложенный в шаблон расчета результатов (программу), смотрите в Приложении 1.

Для получения результатов необходимо:

- внести в расчетную таблицу данные из вкладыша к набору реагентов;
- заполнить графы в разделе **Информация о постановке**;
- скопировать названия образцов и значения *St* для всех каналов;
- нажать кнопку **Рассчитать**, после чего в соответствующих графах автоматически появятся:
 - 1) значения коэффициентов соотношений концентраций (КС1, КС2 и КС3),
 - 2) статус образцов,
 - 3) заключения по результатам исследования каждого образца.

Полученные значения концентрации *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp., *Bacteria* рассчитываются в ГЭ/мл.

Для пересчета концентраций *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp., *Bacteria* в копий/мл, используют формулу:

$$\text{[Число копий/мл] ДНК микроорганизмов} = \text{[Число ГЭ/мл]} \times \text{К}$$

ВНИМАНИЕ! Коэффициент **К** для пересчета результата в копий/мл указан во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Далее полученные результаты и заключения необходимо перенести в форму выдачи результатов, утверждённую в лаборатории. При выдаче результатов необходимо указывать референсные значения для каждого исследуемого параметра. Для общего количества ДНК *Bacteria* референсное значение составляет $\geq 10^6$ ГЭ/мл. Меньшее количество ДНК *Bacteria* в образце может быть получено вследствие неадекватного получения материала, исследования материала от девочек до наступления менархе или женщин, находящихся в менопаузе, применения антибактериальных препаратов/антисептиков или спринцевания в течение 2-х недель до получения материала для анализа и т.д. У здоровой женщины

количество ДНК *Lactobacillus* spp. должно быть практически равным концентрации ДНК Bacteria, т.к. нормальная вагинальная микрофлора представлена, главным образом, лактобактериями. *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* могут присутствовать на слизистой влагалища в невысоких концентрациях, не превышающих концентрацию ДНК *Lactobacillus* spp.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Появление любого значения **Calc Conc** более 5 копий на реакцию (200 ГЭ/мл) в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (OK) и/или этапа ПЦР (K-) на каналах для флуорофоров FAM/Green и/или JOE/HEX/Yellow свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, в которых обнаружена ДНК *Gardnerella vaginalis* и/или *Atopobium vaginae*, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Значения копий на реакцию в калибраторах FC1, FC2 более чем на 30 % отличаются от заданных – необходимо проверить порядок размещения пробирок в приборе. Для приборов роторного типа лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (не пустой).
3. Коэффициент корреляции R^2 менее 0,9 – сбой калибровки. Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. Если это не помогает, переставить ПЦР для всех проб и калибраторов.
4. Отсутствие значений *Ct* в таблице результатов для положительного контроля экстракции (BV-) по каналам для флуорофоров ROX/Orange или Cy5/Red. Результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов с этапа ПЦР.
5. Отсутствие значений *Ct* в таблице результатов для положительного контроля экстракции (BV+) по одному из каналов для флуорофоров: FAM/Green, JOE/HEX/Yellow, ROX/Orange или Cy5/Red или по нескольким каналам. Результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов с этапа ПЦР.
6. В случае отсутствия сигнала по каналу для флуорофора **Cy5** или в случае, когда значение по каналу для флуорофора **Cy5** для исследуемого образца менее 10^5 ГЭ/мл, результат анализа образца считается недостоверным. Рекомендуется переставить ПЦР для данного образца, в случае воспроизводимости результата рекомендуется повторное взятие материала.
7. Если сигнал по каналу для флуорофора **Cy5** отсутствует (нет значения *Ct*) или когда для исследуемого образца количество *Lactobacillus* spp. превышает общее количество бактерий более чем на $0,5Lg$, результат анализа образца считается **невалидным**, такая проба подлежит повторному тестированию, начиная с этапа

экстракции ДНК. В случае воспроизводимости результата рекомендуется повторное взятие материала.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Шаблон расчета результатов (программа) в формате Microsoft® Excel для получения заключений рассчитывает коэффициенты соотношений концентраций КС1, КС2 и КС3:

Коэффициент соотношения КС1 отражает соотношение концентраций *Lactobacillus* spp. (Lac) и анаэробных микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis*+*Atopobium vaginae* (Gv+Av)), равен разнице логарифмов концентраций ДНК указанных микроорганизмов:

$$КС1 = \lg [\text{ДНК Lac}] - \lg [\text{ДНК Gv+Av}].$$

Коэффициент соотношения КС2 отражает соотношение концентраций общего количества бактерий (Bac) и *Lactobacillus* spp. (Lac), равен разнице логарифмов концентраций ДНК указанных микроорганизмов:

$$КС2 = \lg [\text{ДНК Bac}] - \lg [\text{ДНК Lac}].$$

Коэффициент соотношения КС3 отражает соотношение концентраций общего количества бактерий (Bac) и анаэробных микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis*+*Atopobium vaginae* (GA)), равен разнице логарифмов концентраций ДНК указанных микроорганизмов:

$$КС3 = \lg [\text{ДНК Bac}] - \lg [\text{ДНК Gv+Av}].$$

На основании КС1, КС2 и КС3 автоматически выдаются следующие заключения:

- «Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу» (при $КС1 < 0,5$),
- «На основании соотношений концентраций ДНК микроорганизмов бактериальный вагиноз не установлен» (при $КС1 > 1$),
- «Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют промежуточному состоянию микрофлоры» (при $0,5 \leq КС1 \leq 1$),
- «Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют дисбиозу неуточненной этиологии» (при $КС2 > 1$ и $КС3 > 2$ и любых значениях КС1),
- «Снижение степени бактериальной обсеменённости» (при $КС1 > 1$ и общем количестве ДНК бактерий менее 10^6 ГЭ/мл и более 10^5 ГЭ/мл),
- «Количество бактерий недостаточно для анализа» (при общем количестве ДНК бактерий менее 10^5 ГЭ/мл).

Примеры выдачи результатов:

1. Количество *G.vaginalis* и/или *A.vaginae* практически равно или превышает количество *Lactobacillus* spp. – «Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу».

Параметры	Результат	Референсные значения
ДНК Bacteria - общее количество бактерий (ГЭ/мл)	$3 \cdot 10^7$	$\geq 10^6$
ДНК <i>Lactobacillus</i> spp. (ГЭ/мл)	$3 \cdot 10^4$	Не менее концентрации ДНК Bacteria
ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> (ГЭ/мл)	$2 \cdot 10^7$	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
ДНК <i>Atopobium vaginae</i> (ГЭ/мл)	$3 \cdot 10^6$	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
Заключение по результатам исследования	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу	
Примечание – При лечении стоит учитывать, что <i>Atopobium vaginae</i> проявляет повышенную устойчивость к метронидазолу.* * Данное примечание принципиально при выдаче результатов, т.к. обнаружение <i>Atopobium vaginae</i> в клиническом материале может потребовать изменения тактики терапии выявленного состояния		

2. *G.vaginalis* и/или *A.vaginae* отсутствуют, или их количество существенно меньше количества *Lactobacillus* spp. – «На основании соотношений ДНК микроорганизмов бактериальный вагиноз не установлен».

Параметры	Результат	Референсные значения
ДНК Bacteria - общее количество бактерий (ГЭ/мл)	$1 \cdot 10^7$	$\geq 10^6$
ДНК <i>Lactobacillus</i> spp. (ГЭ/мл)	$1 \cdot 10^7$	Не менее концентрации ДНК Bacteria
ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
ДНК <i>Atopobium vaginae</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
Заключение по результатам исследования	На основании соотношений ДНК микроорганизмов бактериальный вагиноз не установлен	

3. Количество *G.vaginalis* и/или *A.vaginae* близко к количеству *Lactobacillus* spp., но не превышает пограничного значения – «Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют промежуточному состоянию микрофлоры».

Параметры	Результат	Референсные значения
ДНК Bacteria - общее количество бактерий (ГЭ/мл)	$8 \cdot 10^6$	$\geq 10^6$
ДНК <i>Lactobacillus</i> spp. (ГЭ/мл)	$8 \cdot 10^6$	Не менее концентрации ДНК Bacteria
ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> (ГЭ/мл)	$2 \cdot 10^6$	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
ДНК <i>Atopobium vaginae</i> (ГЭ/мл)	$2 \cdot 10^4$	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
Заключение по результатам исследования	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют промежуточному состоянию микрофлоры	

4. Количество *Lactobacillus* spp. снижено относительно общего количества бактерий, при этом *G.vaginalis* и/или *A.vaginae* отсутствуют, или их количество существенно меньше общего количества бактерий – «Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют дисбиозу неуточненной этиологии».

Параметры	Результат	Референсные значения
ДНК Bacteria - общее количество бактерий (ГЭ/мл)	$1 \cdot 10^7$	$\geq 10^6$
ДНК <i>Lactobacillus</i> spp. (ГЭ/мл)	$4 \cdot 10^3$	Не менее концентрации ДНК Bacteria
ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
ДНК <i>Atopobium vaginae</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
Заключение по результатам исследования	Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют дисбиозу неуточненной этиологии	

5. *G.vaginalis* и/или *A.vaginae* отсутствуют, или их количество существенно меньше количества *Lactobacillus* spp., общее количество ДНК бактерий менее 10^6 ГЭ/мл и более 10^5 ГЭ/мл – «Снижение степени бактериальной обсеменённости».

Параметры	Результат	Референсные значения
ДНК Bacteria - общее количество бактерий (ГЭ/мл)	$9 \cdot 10^5$	$\geq 10^6$
ДНК <i>Lactobacillus</i> spp. (ГЭ/мл)	$8 \cdot 10^5$	Не менее концентрации ДНК Bacteria
ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
ДНК <i>Atopobium vaginae</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
Заключение по результатам исследования	Снижение степени бактериальной обсеменённости	

6. Общее количество ДНК бактерий менее 10^5 ГЭ/мл – «Количество бактерий недостаточно для анализа».

Параметры	Результат	Референсные значения
ДНК Bacteria - общее количество бактерий (ГЭ/мл)	$7 \cdot 10^4$	$\geq 10^6$
ДНК <i>Lactobacillus</i> spp. (ГЭ/мл)	$1 \cdot 10^3$	Не менее концентрации ДНК Bacteria
ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
ДНК <i>Atopobium vaginae</i> (ГЭ/мл)	Не обнаружено	Не превышает концентрацию ДНК <i>Lactobacillus</i>
Заключение по результатам исследования	Количество бактерий недостаточно для анализа	