

**РУКОВОДСТВО
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
для обнаружения специфических участков
ДНК возбудителей инфекций
методом ПЦР
с флуоресцентной детекцией результата
ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» (End Point)**

Для наборов, произведенных с 01.11.2010 г.

Формат ФЛУОРОПОЛ-КТ

ОГЛАВЛЕНИЕ

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ФОРМАТА «ФЛУОРОПОЛ–КТ»

Назначение	4
Принцип метода	4
Аналитические характеристики	4
Меры предосторожности	6
Состав набора	6
Оборудование, реагенты и материалы	7
Пробоподготовка	8
Проведение анализа	11
Условия хранения и эксплуатации набора	13

ПРИЛОЖЕНИЕ

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «Джин» (ДНК-Технология)

Общие сведения	14
Перед началом работы	14
Постановка реакции амплификации	16
Создание протокола измерений	18
Детекция продуктов амплификации	19
Анализ и интерпретация результатов	21
Работа с сохранённым протоколом	23

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «Джин-4» (ДНК-Технология)

Общие сведения	23
Перед началом работы	23
Постановка реакции амплификации	25
Создание протокола измерений	27
Детекция продуктов амплификации	28
Анализ и интерпретация результатов	30
Работа с сохранённым протоколом	32

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «АЛА-1/4» (НПФ «BioSan»)

Общие сведения	33
Перед началом работы	33
Постановка реакции амплификации	36
Создание протокола измерений	37
Детекция продуктов амплификации	38
Анализ и интерпретация результатов	39

ВНИМАНИЕ!

В комплектах реагентов для амплификации, выпускаемых НПФ «Литех», используется система внутреннего контроля, в которой матрицей является геномная ДНК человека, поступающая в составе пробы. Данный подход позволяет контролировать не только **ингибирование** и **адекватность постановки** реакции, но и другие параметры:

- ✓ корректность забора клинической пробы;
- ✓ эффективность пробоподготовки;
- ✓ ошибки в проведении анализа (в т.ч. не внесение образца в амплификационную смесь);
- ✓ контаминацию на ранних стадиях (до стадии, обуславливающей необходимость повтора анализа).

Данная система обуславливает некоторые особенности в интерпретации результатов анализа см. Табл.№1.

Таблица 1.

	Результат	Специфика*	ВК*	Интерпретация
К+	+	Сигнал > «+»	любой	Реакция прошла
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Реакция не прошла. НЕОБХОДИМА перестановка
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	
К-	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Контаминация отсутствует
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ, <i>но рекомендуется проведение антиконтаминационных мероприятий.</i>
	+	Сигнал > «+»	любой	Специфическая контаминация. НЕОБХОДИМА перестановка.
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	
Искусственный образец плазмиды, культура клеток, стандарт, и т.д.)	+	Сигнал > «+»	любой	Положительная проба
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Отрицательная проба
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
Клинический образец	+	Сигнал > «+»	любой	Положительная проба
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Отрицательная проба
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Недостовверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
фон	фон	Не интерпретируется.		

* Сигнал соответствующего канала сравнивается со следующими пороговыми значениями:

- для специфического сигнала (Специфика) – положительным «+» и отрицательным «-» пороговыми значениями;
- для внутреннего контроля (ВК) – с пороговым значением внутреннего контроля «ВК».

РУКОВОДСТВО

по применению наборов реагентов для обнаружения ДНК возбудителей бактериальных и вирусных инфекций методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «по конечной точке»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. НПФ «Литех» выпускает наборы реагентов для выявления ДНК возбудителей инфекций методом ПЦР с детекцией результата по «конечной точке». Набор состоит из двух комплектов:

1. Комплект для выделения ДНК («ДНК-экспресс»)
2. Комплект для амплификации и последующей флуоресцентной детекции «по конечной точке» - формат «Флуоропол-КТ»

Наборы реагентов формата ФЛУОРОПОЛ-КТ предназначены для качественного обнаружения ДНК возбудителей бактериальных и вирусных инфекций в биологических пробах (соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала, уретры, конъюнктивы глаз, задней стенки глотки; осадок мочи, сперма, отделяемое простаты, ликвор, синовиальная жидкость, смывы из бронхов, мокрота, лейкоцитарная масса крови) методом полимеразной цепной реакции.

1.2. Наборы реагентов ФЛУОРОПОЛ-КТ могут быть использованы в клинической диагностике носительства урогенитальных инфекций, а также для оценки эффективности терапии.

1.3. Наборы предназначены только для применения *in vitro*. Набор имеет 2 варианта комплектации предназначенных для амплификации и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами: «Нераскапанный» (состоит из 5 компонентов, требующих смешения при подготовке к проведению ПЦР) и «One Step» (раскапанный в амплификационные пробирки, полностью готовые смеси под слоем масла).

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.1. Принцип действия наборов формата ФЛУОРОПОЛ основан на использовании накопления флуоресценции от разрушения флуоресцентно-меченных зондов, определяющих специфические участки ампликонов в процессе ПЦР (оценка «ПЦР в реальном времени») или по окончании ПЦР (оценка «ПЦР по конечной точке»).

В методе «ПЦР по конечной точке» (ПЦР-КТ) в отличие от «ПЦР в реальном времени» (ПЦР-РВ) измерение флуоресценции происходит строго относительно фоновых значений отдельно от амплификатора в специальном флуориметре.

Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

Анализ проб с использованием набора ФЛУОРОПОЛ «ПЦР-КТ» включает 3 этапа:

1. Обработка биологической пробы (выделение ДНК).
2. Постановка реакции ПЦР-амплификации.
3. Флуориметрическая детекция продуктов амплификации.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа - 100%.

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами, гибридизующимися с комплементарным участком ампликона (специфического продукта амплификации)

бактероидов (*Bacteroides spp.*)

вируса Эпштейна-Барр (*Epstein-Barr virus*)

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 16 и 18 типа

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 6 и 11 типа

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 31 и 33 типа

вирусов простого герпеса (*Herpes Simplex virus*) 1 и 2 типа

гарднерелл (*Gardnerella vaginalis*)
гонококка (*Neisseria gonorrhoeae*)
кандиды (*Candida albicans*)
лактобацилл (*Lactobacillus spp.*)
микоплазм (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*)
мобилункуса (*Mobiluncus curtisii*)
токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*)
трихомонад (*Trichomonas vaginalis*)
уреаплазм (*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma spp.*)
хламидий (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumonia*)
цитомегаловируса (*Cytomegalovirus*)
кишечной палочки (*Escherichia coli*)
протеев (*Proteus spp.*)
синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*)
энтерококков (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*)
энтеробактерий (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*)
серраций (*Serratia spp.*)
стафилококков (*Staphylococcus aureus*)
стрептококков (*Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*)
атопобиума (*Atopobium vaginae*)
дифтерий (*Corynebacterium diphtheriae*)
листерий (*Listeria spp.*)
микобактерий (*Mycobacterium tuberculosis*, *bovis*)
резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином
резистентность *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином

3.2. Чувствительность анализа для некоторых патогенов составляет:

бактероидов (*Bacteroides spp.*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
вируса папилломы человека (*Human papilloma virus*) 16 типа – $1,6 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл
вируса папилломы человека (*Human papilloma virus*) 18 типа – $1,6 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл
вируса папилломы человека (*Human papilloma virus*) 6 типа – 10^4 геном-эквивалентов/мл
вируса папилломы человека (*Human papilloma virus*) 11 типа – 10^4 геном-эквивалентов/мл
вируса папилломы человека (*Human papilloma virus*) 31 типа – 10^4 геном-эквивалентов/мл
вируса папилломы человека (*Human papilloma virus*) 33 типа – 10^4 геном-эквивалентов/мл
вируса простого герпеса (*Herpes Simplex virus*) 1 типа – $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл
вируса простого герпеса (*Herpes Simplex virus*) 2 типа – $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл
вируса Эпштейна-Барр (*Epstein-Barr virus*) – $3 \cdot 10^4$ геном-эквивалентов/мл
гарднерелл (*Gardnerella vaginalis*) – 10^6 геном-эквивалентов/мл
гонококка (*Neisseria gonorrhoeae*) – $5 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл
кандиды (*Candida albicans*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
лактобацилл (*Lactobacillus spp.*) – 10^6 геном-эквивалентов/мл
микоплазм (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
мобилункуса (*Mobiluncus curtisii*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*) – 10^3 геном-эквивалентов/мл
трихомонад (*Trichomonas vaginalis*) – 10^3 геном-эквивалентов/мл
уреаплазм (*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma spp.*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
хламидий (*Chlamydia trachomatis*) – 10^3 геном-эквивалентов/мл
цитомегаловируса (*Cytomegalovirus*) – $2 \cdot 10^4$ геном-эквивалентов/мл
кишечной палочки (*Escherichia coli*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
протеев (*Proteus spp.*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
энтерококков (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
энтеробактерий (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
серраций (*Serratia spp.*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
стафилококков (*Staphylococcus aureus*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
стрептококков (*Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
атопобиума (*Atopobium vaginae*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл
хламидий (*Chlamydia pneumonia*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл

дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
листерий (*Listeria spp.*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
микобактерий (*Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis*) – 5·10³ геном-эквивалентов/мл
резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
резистентность *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином – 10⁴ геном-эквивалентов/мл

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - 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.).

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. биологический материал человека может являться источником инфекционных или вирусных заболеваний.

5. СОСТАВ НАБОРА

5.1. **Комплект для пробоподготовки (выделение ДНК)** – это реагент в пробирках для транспортировки и выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции («ДНК-ЭКСПРЕСС-неокрашенный»).

Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС-неокрашенный» состоит из пробирок типа Эппендорфф объемом 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащих по 300 мкл реагента.

Комплект на 100 определений 100 пробирок (по 300 мкл реагента)

5.2. Комплекты реагентов для проведения ПЦР-амплификации формата Флуоропол:

1. БАКТОПОЛ (*Bacteroides spp.*)
2. ВИПАПОЛ 16 (*Human papilloma virus 16*)
3. ВИПАПОЛ 16/18 (*Human papilloma virus 16,18 без дифференцировки типа*)
4. ВИПАПОЛ 16/18 (*Human papilloma virus 16,18 с дифференцировкой типа*)*
5. ВИПАПОЛ 18 (*Human papilloma virus 18*)
6. ВИПАПОЛ 6/11 (*Human papilloma virus 6,11 без дифференцировки типа*)
7. ВИПАПОЛ 6/11 (*Human papilloma virus 6,11 с дифференцировкой типа*)*
8. ВИПАПОЛ 31/33 (*Human papilloma virus 31,33 без дифференцировки типа*)
9. ГАРДПОЛ (*Gardnerella vaginalis*)
10. ГЕРПОЛ I (*Herpes Simplex virus type 1*)
11. ГЕРПОЛ I + II (*Herpes Simplex virus type 1+ type 2*)
12. ГЕРПОЛ II (*Herpes Simplex virus type 2*)
13. ГОНОПОЛ (*Neisseria gonorrhoeae*)
14. КАНДИПОЛ (*Candida albicans*)
15. ЛАКТОПОЛ (*Lactobacillus spp.*)
16. МОБИКУРТ (*Mobiluncus curtisii*)
17. ПОЛИМИК-2 (*Mycoplasma genitalium*)
18. ПОЛИМИК-Мк (*Mycoplasma hominis*)
19. ПОЛИМИК-Хл (*Chlamydia trachomatis*)
20. ПОЛИМИК-Ур (*Ureaplasma spp.*)
21. УРЕАПОЛ-parvum (*Ureaplasma parvum*)
22. УРЕАПОЛ-urealyticum (*Ureaplasma urealyticum*)
23. ТОКСОПОЛ (*Toxoplasma gondii*)
24. ТРИПОЛ (*Trichomonas vaginalis*)
25. ЦИТОПОЛ (*Cytomegalovirus*)
26. ЭБАРПОЛ (*Epstein-Barr virus*)
27. Комплект для ПЦР-диагностики **БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА** (*Lactobacillus spp., Ureaplasma spp., Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis, Bacteroides spp., Mobiluncus curtisii*)
28. КОЛИПОЛ (*Escherichia coli*)
29. ПРОТЕПОЛ (*Proteus spp.*)
30. АРУГИПОЛ (*Pseudomonas aeruginosa*)

31. ЭНКОПОЛ (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*)
32. ЭНТЕРОПОЛ (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.)
33. СЕРАТИПОЛ (*Serratia* spp.)
34. СТАФИПОЛ (*Staphylococcus aureus*)
35. СТРЕПТОПОЛ (*Streptococcus* spp.)
36. СТРЕПТОПОЛ-А (*Streptococcus pyogenes*)
37. АТОПОЛ (*Atopobium vaginae*)
38. ПОЛИДИФ (*Corynebacterium diphtheriae*)
39. ПНЕВМОПОЛ-ХЛ (*Chlamydia pneumonia*)
40. ЛИСТЕРИОПОЛ (*Listeria* spp)
41. ПОЛИТУБ (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*)
42. ЭНТЕРОЦЕФ (Резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспоринам)
43. СТАФИЛОЦЕФ (Резистентность *Staphylococcus aureus* к цефалоспоринам)
44. ФЛУОРОПЛЕКС Chl.tr.+M.hom. (*Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma hominis*) с дифференциацией возбудителя*
45. ФЛУОРОПЛЕКС N.gon.+Trich.vag. (*Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis*) с дифференциацией возбудителя *

* - для приборов с возможностью детекции по каналу Rox («Джин-4» ЗАО ДНК-технология и АПА-1/4 BioSan).

Комплекты реагентов для проведения ПЦР-амплификации выпускаются отдельно для каждого вида возбудителя и отличаются комплектацией, специфическими праймерами и зондом, входящими в состав реакционной смеси. Состав комплекта указан в таблице №2.

Таблица 2

Состав комплекта	Количество	Комплектация
1. Реакционная смесь 5 ^x концентрат *	1 пробирка – 680 мкл	“нераскапанные”
2. Таq-полимераза.....	1 пробирка – 30 мкл	
3. Разбавитель.....	1 пробирка – 2 мл	
4. Минеральное масло.....	2 пробирки – 2 мл	
5. Положительный контрольный образец ДНК.....	1 пробирка – 60 мкл	
1. Пробирки 0,5 мл с готовой реакционной смесью	54 шт.	“One Step”
2. Пробирки 0,5 мл с фоновой смесью	6 шт.	
3. Пробирка с положительным контролем	1 шт. - 55 мкл	
4. Пробирка с разбавителем	1 шт. - 100 мкл	

Комплекты для проведения амплификации включают готовые к применению реагенты.

* В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфических праймеров для каждого возбудителя;
- Real-Time ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (2 или 3 зонда): зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор FAM (в некоторых наборах также ROX), зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

5.3. Флуоресцентная детекция:

Флуоресцентная детекция продуктов ПЦР-амплификации в режиме «конечная точка» проводится после её проведения в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией и не требует дополнительного комплекта реагентов для детекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1 этап – выделение ДНК из биопробы

- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС» неокрашенный;
- ламинарный бокс 2 класса защиты;

- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8000–14000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1500–3000 об/мин (или вортекс);
- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорфф, поддерживающий температуру до 99 °С;
- пипетки-дозаторы переменного объема (5-50; 20-200; 100-1000 мкл);
- штативы для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов и анализируемых образцов

2 этап - проведение ПЦР-амплификации

- комплект реагентов для проведения ПЦР (формат ФЛУОРОПОЛ);
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- программируемый термостат (амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс 1500-3000 об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5-50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов;
- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл или 0,2 мл для амплификации согласно требованиям производителя прибора;
- одноразовые наконечники до 200 мкл и до 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 50, 100 или 200 мкл для биопроб;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- ёмкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;

3 этап – анализ результатов ПЦР - флуоресцентный детектор.

7. ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. ВЫБОР АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Выбор клинического материала для исследования определяется наиболее вероятным местом локализации возбудителя. Наиболее адекватный материал для выявления возбудителей приведен в таблице № 3. Решение о выборе материала для исследования принимается врачом на основании совокупности жалоб пациента и клинических проявлений инфекции.

Таблица 3

Возбудитель	Адекватный материал для выявления												
	соскоб эпителиальных клеток			мазки		сперма, секрет простаты	моча	слюна	ликвор	сывороточная жидкость	смывы из бронхов, мокрота, БАЛ, плевральная жидкость	лейкоцитарная масса крови	цельная кровь
	цервикальный канал	уретра	конъюнктив	влагалище	рогозлотка								
<i>Bacteroides spp.</i>				•							•		
<i>Candida albicans</i>	•	•		•			•				•		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	•	•	•			•	•		•		•		
<i>Cytomegalovirus</i>	•	•	•	•			•	•	•			•	
<i>Epstein Barr virus</i>							•	•				•	
<i>Gardnerella vaginalis</i>		•		•									
<i>HPV</i>	•												
<i>HSV 1,2</i>	•	•	•	•		•	•	•				•	
<i>Lactobacillus spp.</i>				•									
<i>Mobiluncus curtisii</i>				•									
<i>Mycoplasma genitalium</i>		•		•		•	•						
<i>Mycoplasma hominis</i>		•		•		•	•						
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	•	•	•		•	•	•						
<i>Toxoplasma gondii</i>									•			•	•
<i>Trichomonas vaginalis</i>	•	•		•		•							

<i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> , <i>Ureaplasma spp.</i>		•		•		•	•						
<i>Escherichia coli</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Proteus spp.</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
(<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>)	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Serratia spp.</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Staphylococcus aureus</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Streptococcus spp.</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Streptococcus pyogenes</i>				•				•			•		
<i>Atopobium vaginae</i>	•	•		•				•					
<i>Chlamydia pneumoniae</i>				•				•			•		
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>			•	•				•			•		
<i>Listeria spp.</i>	•	•		•				•	•			•	•
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>								•			•		
Резистентность <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспорином	•	•		•	•	•	•	•			•		
Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспорином	•	•		•	•	•	•	•			•		

7.2. ВЗЯТИЕ, ДОСТАВКА и ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА

Взятие биологического материала, по возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. Материал для исследования у женщин следует брать перед менструацией или через 1-2 дня после ее окончания. Женщины накануне обследования на ЗППП не должны проводить туалет наружных половых органов и спринцевание. Взятие биоматериала для контроля эффективности лечения должно проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии.

Количество материала, забираемого для исследования, не должно быть избыточным, т.к. вместе с возбудителем в пробу попадают вещества, которые могут вызывать ингибирование ПЦР или могут способствовать деградации ДНК при хранении и транспортировке. При взятии мазков и соскобов достаточное количество материала - размером "со спичечную головку". Наиболее адекватным инструментом для взятия соскобов и мазков для ПЦР-анализа является специальный одноразовый урогенитальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую, почти не впитывает образец и хорошо отдает собранный материал в жидкую транспортную среду. Особенности взятия, доставки и хранения биоматериала указаны в таблице № 4.

Таблица 4

материал	Взятие образца для анализа	Хранение, транспортировка
мазки, соскобы	образцы помещаются <u>непосредственно в пробирки с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС».</u>	неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК.
сперма, секрет простаты	Образцы собираются в одноразовую сухую стерильную пробирку.	Допускается хранение биопроб при +4...+8 °С - не более 1 суток, при -18...-20 °С - не более 2-х недель
моча	собрать первую и среднюю порцию утренней мочи в количестве 20 мл в сухой стерильный флакон с плотно завинчивающейся крышкой	моча для исследования должна быть свежей (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>). До получения осадка исходный материал образец должен быть доставлен в лабораторию как можно быстрее.
слюна, ликвор, синовиальная жидкость	отобрать 1-1,5 мл исходного материала в сухую стерильную пробирку типа Эппендорфф вместимостью 1,5 мл;	материал для исследования должен быть свежим (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>)
смывы	Собрать в одноразовые плотно завинчивающиеся пробирки в количестве 50 мл	

мокрота, плевральная жидкость	собрать 10 мл в пластиковую центрифужную пробирку объемом 50 мл с плотно завинчивающейся крышкой	
лейкоцитарная масса крови, цельная кровь	500 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 50 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). <i>Гепарин использовать не рекомендуется.</i>	неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8 °С - не более 1 суток; <i>не замораживать!</i>

7.3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛА

- Образцы **мазков и соскобов** в пробирке с «ДНК-ЭКСПРЕСС» не требуют предварительной обработки.
- Образцы **спермы и секрета простаты**: 20-30 (максимум 50) мкл жидкого образца внести пипеткой в пробирку с 300 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС».
- Получение осадка **мочи**:
 Весь объем первой и средней порции мочи тщательно взболтать и 10-15 мл отобрать в стерильную центрифужную пробирку. Центрифугировать 15-20 мин при 1500-3000 об/мин, надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить на дне 0,5-1 мл суспензии.
 Суспензию осадка (0,5-1 мл) перенести в одноразовую пробирку типа Эппендорфф (1,5 мл), пробирку плотно закрыть и центрифугировать при 8000–14000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 сек.
 Тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость.
 При необходимости (подозрение на охлаждение исходной мочи) можно однократно промыть осадок: добавить к осадку 200-300 мкл физ. раствора, ресуспендировать на вортексе, отцентрифугировать и удалить надосадочную жидкость.
 К осадку в пробирке (20-30, но не более 50 мкл) добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.
- Образцы **смывов** обрабатывают для получения осадка так же, как описано для мочи.
- Пробирки с образцами **слюны, ликвора, синовиальной жидкости** отцентрифугировать в течение 10-15 минут при 12000 об/мин, тщательно удалить пипеткой верхний слой жидкости, оставив на дне около 20-30 (но не более 50) мкл. К оставшейся в пробирке жидкой взвеси добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и полученную суспензию перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой;
- К образцам **мокроты, плевральной жидкости** в центрифужной пробирке объемом 50 мл добавить равный объем реагента NALC, перемешать на вортексе в течение 5-20 секунд, инкубировать 15 минут при комнатной температуре, а затем развести 0.067М фосфатным буфером (рН 6.8) до 50 мл, центрифугировать 15 минут при 3000 об/мин, удалить надосадочный раствор. К осадку в пробирке (20-30, но не более 50 мкл) добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.
 Реагент NALC (на 5 проб мокры): 0.25 г ацетилцистеина, 25 мл 4% NaOH, 25 мл 0.1М триНа цитрата (готовые исходные растворы на 100 образцов входят в состав «Комплекта для разжижения мокроты» кат № 030302, «ЛИТЕХ»). Смесь готовят в день использования (раствор не хранится).
- Пробирку с образцом **крови** с антикоагулянтом для получения лейкоцитарной массы аккуратно встряхнуть для перемешивания крови с антикоагулянтом, центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре. Плазму (верхняя фаза) отбрасывают с использованием индивидуального наконечника. Полученную клеточную массу крови (нижняя фаза) необходимо отмыть от эритроцитов. **Методика отмывки**: К 300 мкл осадка клеточной массы крови добавить 1 мл буфера (10мМ трис-HCl, 5мМ MgCl₂, 10мМ NaCl) и оставить на 20 мин при комнатной температуре до полного гемолиза эритроцитов. Отцентрифугировать 5 мин при 3000 об/мин. Процедуру повторить 2 раза. К осадку в пробирке (20-30, но не более 50 мкл) добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

Хранение предварительно обработанных проб в реагенте «ДНК-ЭКСПРЕСС»: при +4...+8 °С - не более 1 суток, при -18...-20 °С - не более 2-х недель.

Доставка проб в лабораторию должна проводиться в термосе со льдом или в термоконтейнере в течение 12 часов.

7.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

7.4.1. Пробирку с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС», содержащую анализируемый материал, тщательно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе (вортексе) в течение 10 секунд.

7.4.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат предварительно прогретый до 98 °С и прогреть при 98 °С в течение 20 минут. Примечание: перед помещением пробирок в термостат

необходимо проверить, чтобы во всех пробирках был зацеплен замочек на крышках. Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру процесса не менее 98°C.

7.4.3. После прогрева пробирки перенести в высокоскоростную микроцентрифугу и центрифугировать при 12000-16000g (8000-14000 об/мин) при температуре +16...+25°C в течение 20-30 сек.

7.4.4. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

Обработанные таким образом пробы хранить при температуре +2...+8°C в течение одной недели или при температуре -18...-20°C в течение 6 мес.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Проведение ПЦР-амплификации

8.1.1. Формат «Флуоропол», комплектация «Нераскапанные».

8.1.1.1. Приготовить и пронумеровать бесцветные пробирки вместимостью 0,5 мл или другой емкости (согласно инструкции к прибору и соответствующему приложению настоящей инструкции, далее ПРИЛОЖЕНИЮ) для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК, отрицательного контрольного образца и, при необходимости, фоновые пробирки. Для детекции результата реакции в конечной точке возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C; подробнее см. ПРИЛОЖЕНИЕ.

8.1.1.2. За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

8.1.1.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 (необходимые количества для каждого прибора, к которому адаптирован набор, указаны в ПРИЛОЖЕНИИ) и тщательно перемешать пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или вортексированием.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Разбавитель, мкл	15	75	150	300	750	1500
5х реакционная смесь, мкл	5	25	50	100	250	500
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000

8.1.1.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести по 20 мкл рабочей смеси.

8.1.1.5. В оставшуюся рабочую смесь внести Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющийся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или вортексированием.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000
Taq-полимераза, мкл	0,2	1	2	4	10	20

8.1.1.6. Внести в приготовленные пробирки, кроме фоновых, по 20 мкл полученной рабочей смеси.

8.1.1.7. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.

8.1.1.8. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

а) в фоновые пробирки - при выделении ДНК из образцов неокрашенным реагентом «ДНК-экспресс» в фоновые пробирки вносится разбавитель. В других случаях вносится реагент, в котором растворена ДНК исследуемых образцов, например, буфер TE, деионизованная вода или др. реагенты;

б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

8.1.1.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

8.1.2. Формат «Флуоропол», комплектация «One Step».

8.1.2.1. Достать пробирки с амплификационной и фоновой смесями, положительным контролем и разбавителем из холодильника в соответствии с количеством анализируемых образцов и промаркировать их.

8.1.2.2. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

в) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Внимание! Пробирки фоновых образцов (маркировка «ФОН») полностью готовы к термоциклированию. Добавление в них каких-либо реагентов недопустимо! Возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C; подробнее см. ПРИЛОЖЕНИЕ.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

8.1.2.3. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

8.2. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по одной из следующих программ:

Программа для обнаружения *Bacteroides spp.*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr virus*, *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex virus 1+2*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, *Human papilloma virus 16+18*, *Human papilloma virus 16*, *Human papilloma virus 18*, *Human papilloma virus 6+11*, *Human papilloma virus 31+33*, *Mobiluncus curtisii*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Corynebacterium diptheriae*, *Listeria spp*, *Mycobacterium (tuberculosis+bovis)*, резистентности *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином, резистентности *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином:

+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	35 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

Программа для обнаружения *Lactobacillus spp.*:

+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	30 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

Примечание. Приведённые программы отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ.

8.3. Детекция продуктов амплификации

8.3.1. Пробирки следует перенести из амплификатора в прибор для детекции результатов реакции (ПЦР-детектор) и провести измерения согласно ПРИЛОЖЕНИЮ и инструкции к прибору.

8.4. Анализ и интерпретация результатов

Внимание! В наборах ФЛУОРОПОЛ используется система внутреннего контроля, матрицей для которой служит геномная ДНК человека, поступающая вместе с пробой. Таким способом осуществляется одновременный контроль как за протеканием реакции, так и за стадией выделения ДНК. Поэтому отсутствие сигнала внутреннего контроля от положительного и отрицательного контрольных образцов при постановке стандартных образцов, контрольных и стандартных панелей, а также анализе бактериальных культур, является нормальным. Присутствие внутреннего сигнала контроля в перечисленных типах образцов свидетельствует о контаминации геномной ДНК человека, что не оказывает влияния на анализ результатов, поскольку соответствует стандартной ситуации, когда матрица внутреннего контроля вводится в смесь на стадии производства. Также является допустимым слабый сигнал внутреннего контроля от положительных (особенно, сильно-положительных) образцов, что связано с конкуренцией за фермент.

8.4.1. При проведении детекции в конечной точке реакции анализ обычно проводится управляющей программой автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений (см. ПРИЛОЖЕНИЕ). Результат выводится в соответствующем месте протокола, зависящем от конкретной программы. Для одновременного анализа по специфическому сигналу и сигналу внутреннего контроля характерна следующая расшифровка результатов (Таблица №5):

Таблица 5

	Результат	Специфика*	ВК*	Интерпретация
К+	+	Сигнал > «+»	любой	Реакция прошла
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Реакция не прошла.
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	НЕОБХОДИМА перестановка
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	
К-	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Контаминация отсутствует
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
	+	Сигнал > «+»	любой	Специфическая контаминация.
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	НЕОБХОДИМА перестановка.
Анализируемый образец	+	Сигнал > «+»	любой	Положительная проба
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Отрицательная проба
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Недостовверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
фон	фон	Не интерпретируется. При сообщении о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок НЕОБХОДИМО: а)если пробирки делались <u>не в той же</u> постановке, что и образцы – ПЕРЕДЕЛАТЬ фоновые пробирки и повторить детекцию всей постановки с новыми (образцы следует сохранить при +4°С и привести к комнатной температуре перед новым измерением); б)если пробирки делались <u>в той же</u> постановке, что и образцы – повторить постановку.		

* Сигнал соответствующего канала сравнивается со следующими пороговыми значениями:

- для специфического сигнала (Специфика) – положительным «+» и отрицательным «-» пороговыми значениями;
- для внутреннего контроля (ВК) – с пороговым значением внутреннего контроля «ВК».

Примечание: при возникновении сомнительных или недостоверных результатов, а также сообщений о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок следует проверить порядок расстановки пробирок в

детекторе, а также сами пробирки на присутствие мешающих детекции факторов (см. ПРИЛОЖЕНИЕ) и при их отсутствии еще 2 раза повторить детекцию. Корректным считать результат, зарегистрированный не менее чем в 2 измерениях из 3.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до +25°C не более 5 суток.

9.2. Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре около 0°C не более 2,5 суток.

9.3. Срок годности наборов формата «нераскапанный» – 6 месяцев, «One Step» - 4 месяца со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

9.4. Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре +2...+8°C не более одной недели или при температуре -18...-20°C не более 6 месяцев.

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

По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю наборов реагентов ФЛУОРОПОЛ.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д.1, стр.3, телефон/факс: (495) 589-14-03, e-mail: info@lytech.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ

Проведение ПЦР с детекцией результата в конечной точке реакции при помощи ПЦР-детектора «Джин» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

ПЦР-детектор «Джин» предназначен для регистрации флуоресцентного сигнала от образцов, прошедших амплификацию с флуоресцентными зондами. Образцы должны находиться в бесцветных пробирках объемом 0,5 мл. ПЦР проводится в амплификаторах, рассчитанных на работу со стандартными пробирками объемом 0,5 мл. Детектор регистрирует сигнал по двум каналам: специфический сигнал (флуорофор FAM) и сигнал от внутреннего контроля (флуорофор HEX). По завершении измерений управляющая программа нормирует сигнал от каждого канала на усредненный сигнал от фоновых пробирок в соответствующем канале. Именно это соотношение сигнал/фон (усредненный фон приравнивается 1) выдается в протокол и используется программой при анализе результатов. Анализ результатов измерений проводится программой автоматически сразу же после завершения измерений согласно прописанным в ее базе пороговым значениям.

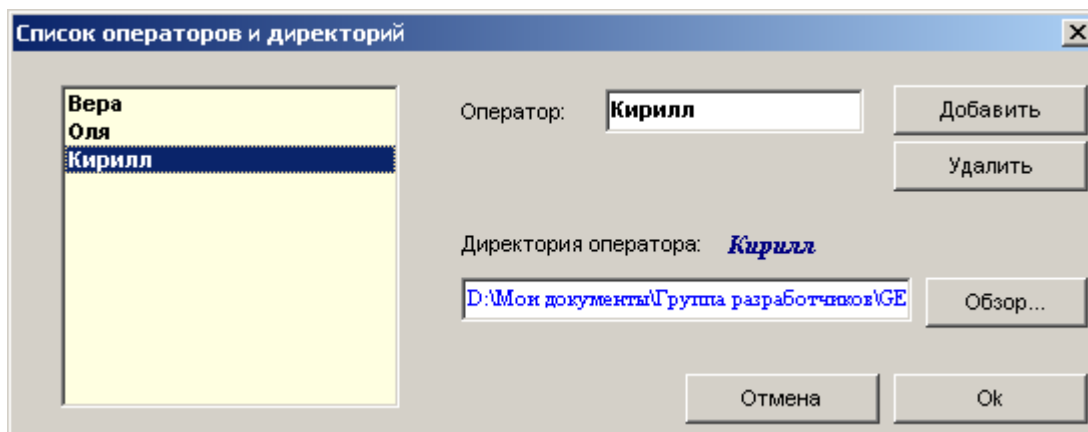
В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами ФЛУОРОПОЛ. Все цвета указаны для принятого по умолчанию оформления результатов. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

Следует помнить, что все описанные в данном приложении действия кроме проведения детекции можно выполнять на компьютере при выключенном ПЦР-детекторе.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Перед первым использованием прибора, а также перед использованием новых наборов и в случае изменения списка работающих с прибором операторов следует проверить и, при необходимости скорректировать следующие настройки программы в меню «Настройки»:

2.1. «Список операторов и директорий». В этом разделе можно добавлять или удалять операторов, а также назначать и изменять уже имеющимся операторам их рабочие папки.



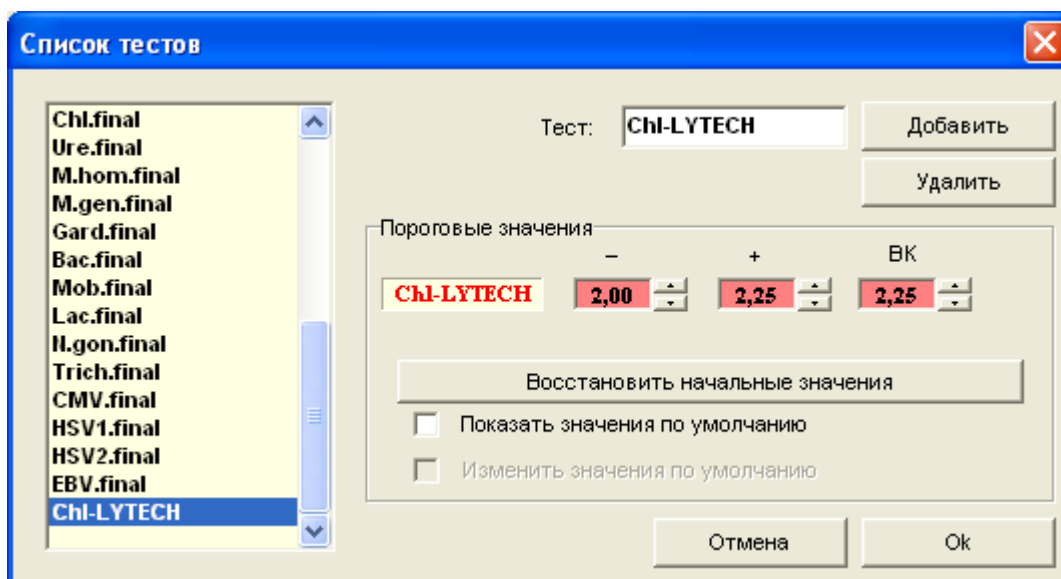
2.1.1. Для добавления оператора следует ввести его имя в поле **Оператор** и нажать кнопку **Добавить**. После этого имя оператора появится в списке слева.

2.1.2. Для присвоения или изменения оператору рабочей папки, где будут сохраняться протоколы измерений, следует выбрать его имя в списке (напротив надписи «Директория оператора» появится имя оператора) и ввести путь к папке в поле **Директория оператора**, либо нажать на кнопку **Обзор** и указать путь к папке. Важно помнить, что программа сама не создает и не удаляет папок, поэтому папка к моменту назначения должна уже существовать. Во избежание путаницы в процессе работы настоятельно рекомендуется присваивать каждому оператору индивидуальную папку!

2.1.3. Для удаления оператора следует выбрать его имя в списке и нажать кнопку **Удалить**. Папка оператора при этом не удаляется.

2.1.4. Для выхода из настроек следует нажать кнопку **Отмена** (выход БЕЗ учета внесенных изменений) или **Ok** (выход С учетом внесенных изменений).

2.2. «Список тестов». В этом разделе указываются тесты, результаты которых будут регистрироваться в приборе, а также задаются пороговые значения для них.



2.2.1. Для добавления нового теста необходимо ввести его наименование в поле **Тест:** и нажать кнопку **Добавить**. После этого тест появится в списке.

2.2.2. Для изменения пороговых значений для теста следует выбрать его название в списке. Оно будет отображено красным в рамке **Пороговые значения**, а в полях «-», «+» и «BK» будут отображены используемые в данный момент пороговые значения (если тест был только что добавлен, это будут значения по умолчанию (начальные значения)). Для возврата к значениям по умолчанию следует нажать кнопку **Восстановить начальные значения**. Следует проверить, соответствуют ли значения рекомендуемым производителем набора и при необходимости внести изменения.

Для наборов ФЛУОРОПОЛ следует выставить следующие пороговые значения:

Возбудитель	-	+	ВК
<i>Bacteroides spp.</i>	5,0	5,9	2,25
<i>Candida albicans</i>	3,5	4,2	2,25
<i>Chlamydia trachomatis</i>	3,3	3,8	2,25
<i>Cytomegalovirus</i>	3,2	3,6	2,25
<i>Epstein Barr virus</i>	3,3	3,7	2,25
<i>Gardnerella vaginalis</i>	12	13	2,25
<i>Herpes simplex virus 1**</i>	2,7	3,0	2,25
<i>Herpes simplex virus 1+2*</i>	2,6	2,9	2,25
<i>Herpes simplex virus 2**</i>	2,7	3,0	2,25
<i>Human papilloma virus 16**</i>	3,6	4,0	2,25
<i>Human papilloma virus 16+18*</i>	2,45	2,8	2,25
<i>Human papilloma virus 18**</i>	3,3	3,7	2,25
<i>Human papilloma virus 6+11*</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Human papilloma virus 31+33*</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Lactobacillus spp.</i>	6,3	7,7	2,25
<i>Mobiluncus curtisii</i>	3,3	3,7	2,25
<i>Mycoplasma genitalium</i>	2,0	2,25	2,25
<i>Mycoplasma hominis</i>	3,4	4,0	2,25
<i>Neisseria gonorrhoeae*</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Toxoplasma gondii</i>	3,8	4,4	2,25
<i>Trichomonas vaginalis</i>	3,3	3,7	2,25
<i>Ureaplasma spp.</i>	3,2	3,7	2,25
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	3,8	4,2	2,25
<i>Ureaplasma parvum</i>	3,7	4,3	2,25
<i>Escherichia coli</i>	3,5	3,8	2,25
<i>Proteus spp.</i>	3,3	3,8	2,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Enterococcus faecalis, E.faecium</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Enterobacter spp., Klebsiella spp.</i>	2,7	3,0	2,25
<i>Serratia spp.</i>	3,6	4,0	2,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2	4,8	2,25
<i>Streptococcus spp.</i>	3,5	4,0	2,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3,0	3,3	2,25
<i>Atopobium vaginae</i>	3,9	4,6	2,25
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	2,7	3,0	2,25
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	4,3	4,9	2,25
<i>Listeria spp.</i>	3,5	3,8	2,25
<i>Mycobacterium (tuberculosis+bovis)</i>	3,2	3,6	2,25
Резистентность <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспоридам	2,5	2,7	2,25
Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспоридам	2,00	2,25	2,25

* Наборы реагентов без конкретизации типа.

** Типоспецифичные наборы.

2.2.3. Для удаления теста следует выбрать его название в списке и нажать кнопку **Удалить**.

2.2.4. Для выхода из настроек следует нажать кнопку **Отмена** (выход БЕЗ учета внесенных изменений) или **Ок** (выход с учетом внесенных изменений).

Внимание! Внесенные настройки сохраняются только при выходе из программы, о чем она выдает запрос при завершении работы.

2.3. «Нумерация пробирок» позволяет задать наиболее удобный и привычный для оператора способ идентификации пробирок, который будет использован как в протоколе, так и при выводе программой сообщений во время детекции результатов.

3. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Формат «Флуоропол», комплектация «Нераскапанные».

3.1.1. Приготовить и пронумеровать бесцветные пробирки вместимостью 0,5 мл или другой емкости (согласно инструкции к прибору и соответствующему приложению настоящей инструкции, далее ПРИЛОЖЕНИЮ) для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК, отрицательного контрольного образца и, при необходимости, фоновые пробирки. Для детекции результата реакции в конечной точке возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C.

3.1.2. За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

3.1.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 и тщательно перемешать пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или вортексированием.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Разбавитель, мкл	15	75	150	300	750	1500
5х реакционная смесь, мкл	5	25	50	100	250	500
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000

3.1.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести по 20 мкл рабочей смеси.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000
Taq-полимераза, мкл	0,2	1	2	4	10	20

3.1.5. В оставшуюся рабочую смесь внести Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющийся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или вортексированием.

3.1.6. Внести в приготовленные пробирки, кроме фоновых, по 20 мкл полученной рабочей смеси.

3.1.7. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.

3.1.8. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

а) фоновые пробирки - при выделении ДНК из образцов неокрашенным реагентом «ДНК-экспресс» в фоновые пробирки вносится разбавитель. В других случаях вносится реагент, в котором растворена ДНК исследуемых образцов, например, буфер TE, деионизованная вода или др. реагенты;

б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

3.1.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250 – 4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

3.2. Формат «One Step». Формат «Флуоропол», комплектация «One Step».

3.2.1. Достать пробирки с амплификационной и фоновой смесями, положительным контролем и разбавителем из холодильника в соответствии с количеством анализируемых образцов и промаркировать их.

3.2.2. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Внимание! Пробирки фоновых образцов (маркировка «ФОН») полностью готовы к термоциклированию. Добавление в них каких-либо реагентов недопустимо! Возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

3.2.3. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

3.3. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по одной из следующих программ:

Программа для обнаружения возбудителей *Bacteroides spp.*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr virus*, *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex virus 1+2*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, *Human papilloma virus 16+18*, *Human papilloma virus 16*, *Human papilloma virus 18*, *Human papilloma virus 6+11*, *Human papilloma virus 31+33*, *Mobiluncus curtisii*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma spp.*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* u *Enterococcus faecium*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria spp.*, *Mycobacterium (tuberculosis+bovis)*, резистентности *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином, резистентности *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином:


+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	35 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

Программа для обнаружения *Lactobacillus spp.*:

+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	30 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ.

4. СОЗДАНИЕ ПРОТОКОЛА ИЗМЕРЕНИЙ.

4.1. Нажать кнопку  на панели инструментов в основном окне управляющей программы или выбрать пункт **Создать** из меню **Протокол**. Программа перейдет в окно создания протокола измерений.

Создание протокола

Оператор: Кирилл Протокол №: 27

	с	по	Тест	Фон	Кол-во	Примечание
✓	1	8	Chi	7,8	2	КВД ХХХ
✓	1	8	Ure	7,8	2	КВД УУУ


Добавить Удалить

Отмена Ок

4.2. В поле **Оператор**: выбирать имя оператора, а в поле **Протокол №**: - номер протокола (после первого введения ненулевого номера программа автоматически начнет предлагать номер следующего протокола).

Важно помнить, что для каждого теста в рамках протокола создается своя строка.

4.3. В столбце «с» ввести номер первой, а в столбце «по» - последней измеряемой пробирки.

4.4. В столбце **Тест** выбрать возбудителя (список открывается при нажатии на кнопку , появляющуюся в выбранном поле), для которого будет проведено измерение.

4.5. В столбце **Кол-во** указать количество фоновых пробирок. По умолчанию используется значение 2 (рекомендуется использовать именно его), однако оно может быть изменено. Число фоновых пробирок не может быть меньше 1 и более, чем общее число пробирок в тесте минус одна. В окне Фон отображаются номера фоновых пробирок (они всегда идут последними в каждом тесте).

4.6. В столбце **Примечание** можно ввести комментарий к тесту.

4.7. Для добавления новой строки следует нажать кнопку **Добавить** или просто перейти на следующую. Добавление новой строки до заполнения поля **Тест** текущей строки НЕВОЗМОЖНО.

4.8. Для удаления строки следует сделать активным (выделенным синим) какое-либо ее поле и нажать кнопку **Удалить**, а затем нажать кнопку **Да** в появившемся окне.

4.9. Для завершения работы с окном следует нажать кнопку **Отмена** (протокол создан НЕ БУДЕТ) или **Ок** и продолжить заполнение протокола в основном окне программы.

Gene

Протокол Настройки Help

Chi Протокол: 27 Оператор: Кирилл

Пробирка	Образец	Результат	Специфика	ВК
1/27	XXX1			
2/27	XXX2			
3/27	XXX3			
4/27	XXX4			
5/27	К-			
6/27	К+			
7/фон(Chi)	фон			
8/фон(Chi)	фон			

* Нормировочные значения 0,00* 0,00*

Примечание: КВД ХХХ


0 1 2

Специфика ВК

DPK - Механизма

12 Октября 2006, 22:31:27 Gene v3.3i (11.10.05)


4.10. Рекомендуется внести названия всех образцов в поля столбца **Образец** (название «фон» для фоновых пробирок вносится программой автоматически) для всех внесенных в протокол тестов. Название теста отображается

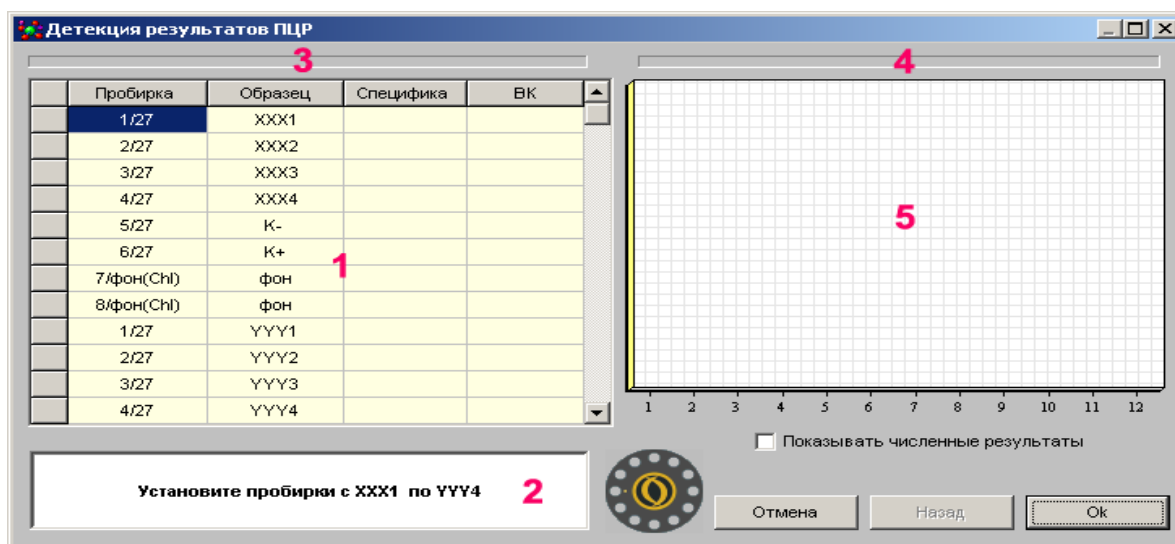
зеленым цветом в черном поле в левой верхней части окна. Для перехода к другим тестам следует раскрыть их список нажатием на кнопку  в правой части поля.

Внимание! Протокол, по которому не были проведены измерения, не может быть сохранен. Закрытие программы, создание нового или открытие ранее сохраненного протокола уничтожают текущий протокол.

5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Для проведения детекции ПЦР-детектор должен быть включен.

5.1. Для перехода в режим измерения следует нажать кнопку  на панели инструментов основного окна программы, либо выбрать пункт **Детекция** в меню **Протокол**. Программа выведет окно проведения измерений.



5.2. Окно проведения измерений имеет следующую структуру:

- В поле **1** выводится информация о последовательности анализируемых в данном цикле пробирок. Во время измерений в этом же окне выводятся численные значения интенсивности специфического сигнала от FAM (столбец Специфика) и сигнала от внутреннего контроля от HEX (столбец ВК) в единицах флуоресценции детектора Джин. Эти данные еще не прошли нормировку на уровень фона, поэтому анализу не подлежат;
- В поле **2** программа выдает сообщения для оператора, согласно которым проводятся измерения;
- Нажатием на кнопку **Ok** оператор подтверждает, что он ознакомился с текстом выданного программой сообщения, принял полученные данные к сведению, выполнил рекомендуемые программой действия и подтверждает переход к следующему шагу измерений.
- Каждое нажатие на кнопку **Назад** возвращает программу к состоянию на момент окончания предыдущего цикла измерений (если нажатие было произведено после первого цикла – к началу измерений). При нажатии на эту кнопку, программа запрашивает подтверждение, поскольку данные, полученные в текущем цикле, будут утеряны;
- Индикаторы прогресса **3** и **4** отображают, насколько завершено измерение протокола в целом (индикатор **3**) и текущего цикла (индикатор **4**);
- В окне **5** в виде столбчатой диаграммы и в числовом виде (если установлен флажок **Показывать численные результаты**) отображаются интенсивности специфического сигнала от FAM (синие столбцы) и сигнала от внутреннего контроля от HEX (зеленые столбцы) в единицах флуоресценции детектора Джин. Эти данные еще не прошли нормировку на уровень фона, поэтому анализу не подлежат;
- Выход из режима измерений без принятия значений сигнала осуществляется кнопкой **Отмена** (прибор потребует подтверждения).

Примечание: кнопки являются активными (черный текст) только в тех случаях, когда программа может выполнить обозначаемое кнопкой в данный момент действие.

Часть информации из окна дублируется на ЖК-дисплее ПЦР-детектора. Подробнее см. инструкцию к прибору.

5.3. Установка пробирок в прибор:

5.3.1. Установка пробирок в ПЦР-детектор осуществляется по требованию управляющей программы в указанном в поле 1 окна измерений порядке. Диапазон пробирок указанный в соответствующем сообщении в поле 2 устанавливается полностью вне зависимости от того, принадлежат пробирки одному тесту или разным. Первая пробирка диапазона должна быть установлена строго в ячейку №1 барабана детектора, вторая – в ячейку №2 и т.д.

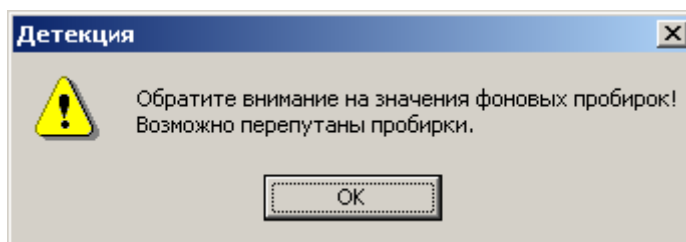
5.3.2. Перед установкой каждую пробирку следует осмотреть на наличие мешающих считыванию результата факторов (и при обнаружении устранить их):

- *содержимое пробирки полностью или частично разбрызгано по стенкам* - центрифугировать пробирку в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе;
- *пузырек воздуха* – удалить постукиванием по пробирке твердым не загрязняющим поверхность предметом (ногтем) и центрифугировать в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе;
- *наличие видимых загрязнений на дне или конической части пробирки* – удалить путем протирания чистым безворсовым материалом.

5.3.3. Пробирки устанавливать в ячейки барабана до упора, но не прикладывая излишних усилий. Ориентация петли и выступа крышки пробирки значения не имеет, если не мешает корректной установке других пробирок.

5.4. Проведение измерений проводится в соответствии с сообщениями программы. После выполнения всех ее требований в данном шаге переход к следующему осуществляется нажатием кнопки **Ok** в окне измерений. При необходимости можно повторить один или несколько циклов измерений, вернувшись к концу предыдущего цикла (началу измерений протокола) кнопкой **Назад**.


Следует внимательно анализировать выдаваемые сообщения и принимать требуемые меры. В случае возникновения сообщения



следует проверить правильность установки и отсутствие факторов мешающих прочтению фоновых пробирок (см. п. 5.3.2.). Если причина ошибки выявлена, следует устранить ее и повторить измерения. Если выявить причину ошибки не удастся, а подобная же ошибка повторяется при повторных измерениях, следует:

- если фоновые пробирки делались в анализируемой постановке – полностью повторить постановку;
- если фоновые пробирки были сделаны ранее – переделать их и повторить измерение постановки с новыми (**анализируемые пробирки могут быть сохранены при +2...+8°C в течение суток**).

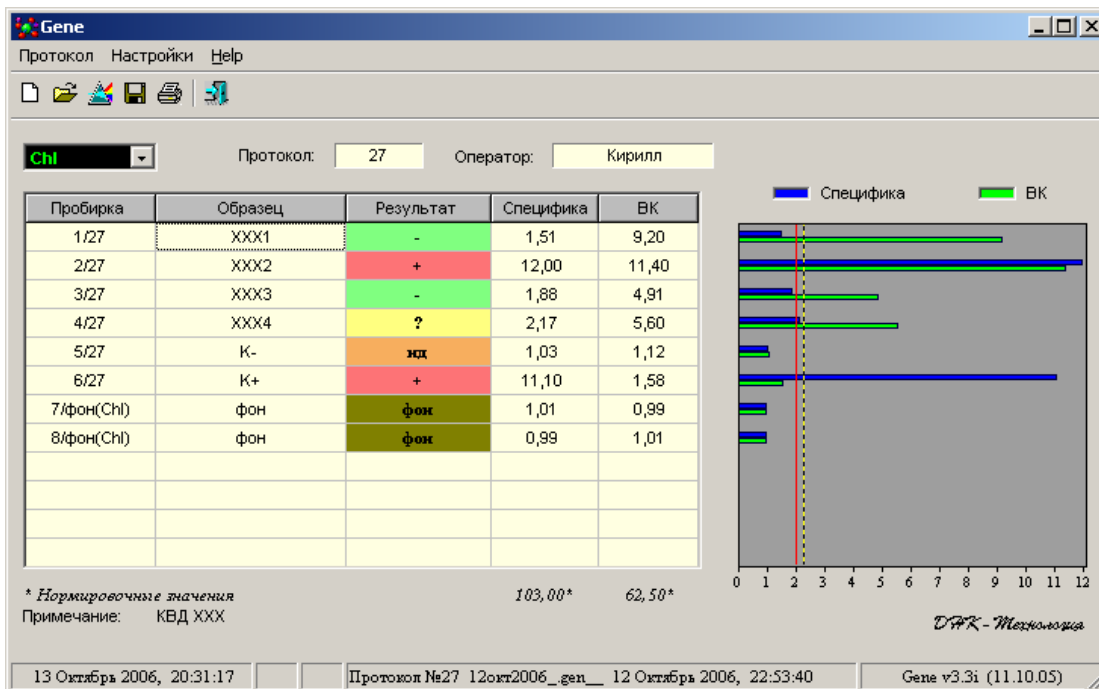
5.5. По завершении измерений после возврата в главное окно программы протокол необходимо сохранить. Для

этого следует нажать кнопку  на панели инструментов или выбрать пункт **Сохранить ...** в меню **Протокол**. По умолчанию программа предложит сохранить протокол в личной папке оператора, проводившего съемку в виде файла с названием «**Протокол №<номер протокола> <дата измерения>**». Протокол сохраняется с результатами анализа (см. п. 6.1.).

5.6. При необходимости можно повторить детекцию результатов по тому же протоколу, если после измерения не создавался и не загружался другой протокол. Для этого повторите все действия, описанные в разделе 5.

6. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1. Нормировка сигнала от каждого канала на усредненный сигнал в соответствующем канале от фоновых пробирок и анализ результатов проводится программой автоматически для каждой пробирки после завершения измерений по протоколу. Результаты выводятся в главном окне программы для каждого теста отдельно (перехода между тестами см. в п. 4.8.):



- В столбце **Результат** выводится качественный результат анализа, определенный на основе сравнения полученных после нормировки значений сигнала с пороговыми.
- В столбцах **Специфика** и **ВК** выводятся численные значения сигнала в соответствующих каналах, нормированные на фон (усредненный фон принимается равным 1, нормировочные коэффициенты для каждого канала выводятся под соответствующим столбцом). Те же значения в графическом виде представлены на диаграмме в правой части окна. Красная линия на ней соответствует пороговому значению «-», желтая – «+», пунктирная черная – «ВК».

6.2. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей:

	Результат	Специфика*	ВК*	Интерпретация
К+	+	Сигнал > «+»	любой	Реакция прошла
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Реакция не прошла. НЕОБХОДИМА перестановка
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	
К-	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Контаминация отсутствует
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
	+	Сигнал > «+»	любой	Специфическая контаминация.
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	НЕОБХОДИМА перестановка.
Анализируемый образец	+	Сигнал > «+»	любой	Положительная проба
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Отрицательная проба
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Недостовверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
фон	фон	Не интерпретируется.		


* Сигнал соответствующего канала сравнивается со следующими пороговыми значениями:

- для специфического сигнала (Специфика) – положительным «+» и отрицательным «-» пороговыми значениями;
- для внутреннего контроля (ВК) – с пороговым значением внутреннего контроля «ВК».


Примечание: при возникновении сомнительных или недостоверных результатов, а также сообщений о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок следует проверить порядок расстановки пробирок в детекторе, а также сами пробирки на присутствие мешающих детекции факторов (см. п. 5.3.) и при их отсутствии еще 2 раза повторить детекцию. **Корректным считать результат, зарегистрированный не менее чем в 2 измерениях из 3.**

7. РАБОТА С СОХРАНЕННЫМ ПРОТОКОЛОМ



7.1. Для загрузки сохраненного ранее протокола следует нажать кнопку  или выбрать пункт **Открыть...** в меню **Протокол**.



7.2. Для печати протокола следует нажать кнопку  или выбрать пункт **Печать ...** в меню **Протокол**. Протокол печатается полностью, таблицы результатов всех тестов идут в том порядке, в котором они указаны в протоколе!

7.3. Протокол может быть экспортирован в виде файла формата Excel. Для этого следует выбрать пункт **Сохранить как ...** в меню **Протокол**.

Внимание! Такие файлы не могут быть загружены обратно в управляющую программу, поэтому экспорт следует проводить только после сохранения протокола!

ПРИЛОЖЕНИЕ

Проведение ПЦР с детекцией результата в конечной точке реакции при помощи ПЦР-детектора «Джин-4» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

ПЦР-детектор «Джин-4» предназначен для регистрации флуоресцентного сигнала от образцов, прошедших амплификацию с флуоресцентными зондами. Образцы должны находиться в бесцветных пробирках объемом 0,5 или 0,2 мл. ПЦР проводится в амплификаторах, рассчитанных на работу со стандартными пробирками объемом 0,5 и 0,2 мл. Детектор регистрирует сигнал по четырем каналам: FAM, HEX, Rox и Cy5. По завершении измерений управляющая программа нормирует сигнал от каждого канала на усредненный сигнал от фоновых пробирок в соответствующем канале. Именно это соотношение сигнал/фон (усредненный фон приравнивается 1) выдается в протокол и используется программой при анализе результатов. Анализ результатов измерений проводится программой автоматически сразу же после завершения измерений согласно прописанным в ее базе пороговым значениям.

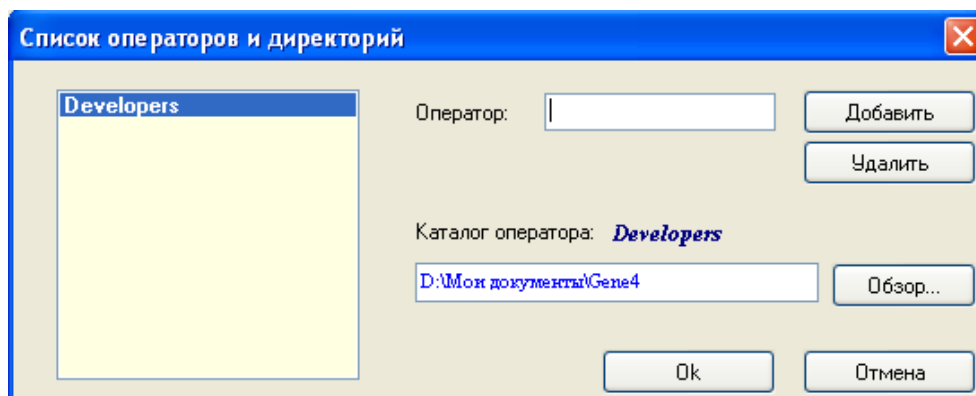
В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами ФЛУОРОПОЛ. Все цвета указаны для принятого по умолчанию оформления результатов. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

Следует помнить, что все описанные в данном приложении действия кроме проведения детекции можно выполнять на компьютере при выключенном ПЦР-детекторе.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Перед первым использованием прибора, а также перед использованием новых наборов и в случае изменения списка работающих с прибором операторов следует проверить и, при необходимости скорректировать следующие настройки программы в меню **«Настройки»**:

2.1. «Список операторов и директорий». В этом разделе можно добавлять или удалять операторов, а также назначать и изменять уже имеющимся операторам их рабочие папки.



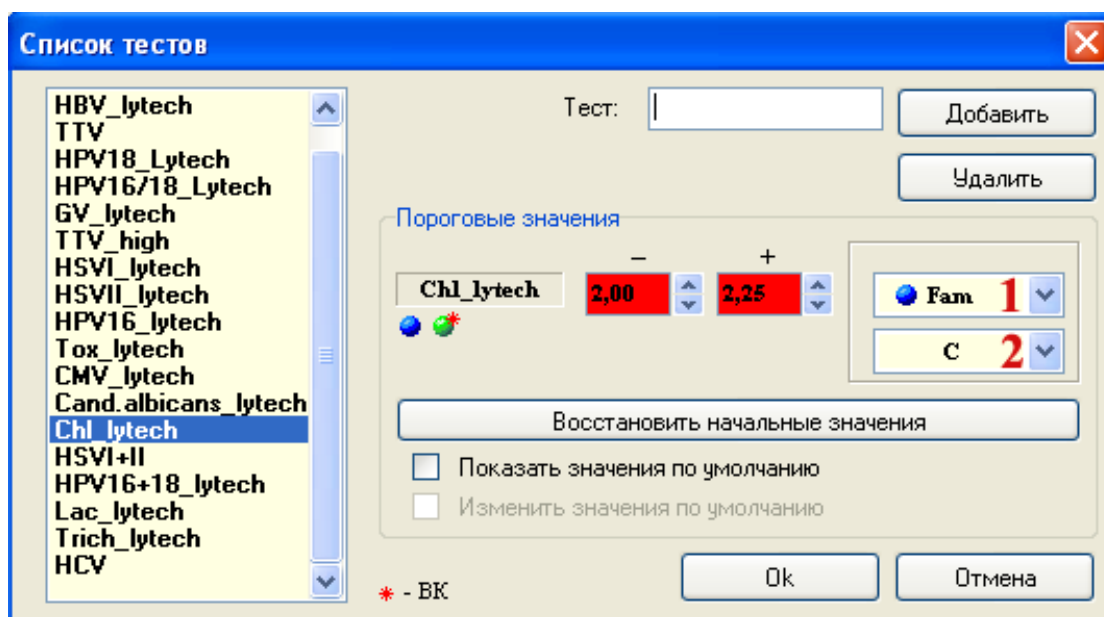
2.1.1. Для добавления оператора следует ввести его имя в поле **Оператор** и нажать кнопку **Добавить**. После этого имя оператора появится в списке слева.

2.1.2. Для присвоения или изменения оператору рабочей папки, где будут сохраняться протоколы измерений, следует выбрать его имя в списке (напротив надписи «Директория оператора» появится имя оператора) и ввести путь к папке в поле **Директория оператора**, либо нажать на кнопку **Обзор** и указать путь к папке. Важно помнить, что программа сама не создает и не удаляет папок, поэтому папка к моменту назначения должна уже существовать. Во избежание путаницы в процессе работы настоятельно рекомендуется присваивать каждому оператору индивидуальную папку!

2.1.3. Для удаления оператора следует выбрать его имя в списке и нажать кнопку **Удалить**. Папка оператора при этом не удаляется.

2.1.4. Для выхода из настроек следует нажать кнопку **Отмена** (выход БЕЗ учета внесенных изменений) или **Ок** (выход С учетом внесенных изменений).

2.2. «Список тестов». В этом разделе указываются тесты, результаты которых будут регистрироваться в приборе, а также задаются каналы считывания и пороговые значения для них.



2.2.1. Для добавления нового теста необходимо ввести его наименование в поле **Тест:** и нажать кнопку **Добавить**. После этого тест появится в списке.

2.2.2. Для изменения настроек теста следует выбрать его название в списке. Затем кнопкой (1) выбрать канал считывания, а кнопкой (2) присвоить ему значение: «С» (Специфика), «ВК» (внутренний контроль) или «не использ.» (канал не используется). Затем для каждого используемого канала следует выставить **пороговые значения** (отображено красным в рамке). Для возврата к значениям по умолчанию следует нажать кнопку **Восстановить начальные значения**. Следует проверить, соответствуют ли значения рекомендуемым производителем набора и при необходимости внести изменения.

Для наборов ФЛУОРОПОЛ следует выставить следующие пороговые значения:

Возбудитель	канал	-	+
Внутренний контроль	HEX		2,25
Bacteroides spp.	FAM	5,0	5,9
Candida albicans	FAM	3,5	4,2
Chlamydia trachomatis	FAM	3,3	3,8
Cytomegalovirus	FAM	3,2	3,6
Epstein Barr virus	FAM	3,3	3,7
Gardnerella vaginalis	FAM	12	13
Herpes simplex virus 1**	FAM	2,7	3,0
Herpes simplex virus 1+2*	FAM	2,6	2,9
Herpes simplex virus 2**	FAM	2,7	3,0
Human papilloma virus 16**	FAM	3,6	4,0
Human papilloma virus 16+18*	FAM	2,45	2,8

<i>Human papilloma virus 16+18**</i>	FAM (16)	3,6	4,0
	ROX (18)	2,2	2,6
<i>Human papilloma virus 18**</i>	FAM	3,3	3,7
<i>Human papilloma virus 6+11*</i>	FAM	3,0	3,3
<i>Human papilloma virus 6+11**</i>	FAM (6)	3,7	4,3
	ROX (11)	2,0	2,3
<i>Human papilloma virus 31+33*</i>	FAM	3,0	3,3
<i>Lactobacillus spp.</i>	FAM	6,3	7,7
<i>Mobiluncus curtisii</i>	FAM	3,3	3,7
<i>Mycoplasma genitalium</i>	FAM	2,0	2,25
<i>Mycoplasma hominis</i>	FAM	3,4	4,0
<i>Neisseria gonorrhoeae*</i>	FAM	3,0	3,3
<i>Toxoplasma gondii</i>	FAM	3,8	4,4
<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	3,3	3,7
<i>Ureaplasma spp.</i>	FAM	3,2	3,7
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	FAM	3,8	4,2
<i>Ureaplasma parvum</i>	FAM	3,7	4,3
<i>Escherichia coli</i>	FAM	3,5	3,8
<i>Proteus spp.</i>	FAM	3,3	3,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	3,0	3,3
<i>Enterococcus faecalis, E.faecium</i>	FAM	3,0	3,3
<i>Enterobacter spp., Klebsiella spp.</i>	FAM	2,7	3,0
<i>Serratia spp.</i>	FAM	3,6	4,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	FAM	4,2	4,8
<i>Streptococcus spp.</i>	FAM	3,5	4,0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	3,0	3,3
<i>Atopobium vaginae</i>	FAM	3,9	4,6
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	FAM	2,7	3,0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	FAM	4,3	4,9
<i>Listeria spp.</i>	FAM	3,5	3,8
<i>Mycobacterium (tuberculosis+bovis)</i>	FAM	3,2	3,6
Резистентность <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспоридам	FAM	2,5	2,7
Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспоридам	FAM	2,00	2,25
ФЛУОРОПЛЕКС <i>Chl.tr.+M.hom.</i> **	FAM(Chl.tr.)	3,3	3,8
	ROX(M.hom.)	2,0	2,3
ФЛУОРОПЛЕКС <i>N.gon.+Trich.vag.</i> **	FAM(N.gon.)	3,5	4,0
	ROX(Trich.vag.)	3,0	3,3

* Наборы реагентов без конкретизации типа.

** Типоспецифичные наборы.

Канал считывания **Су5** не используется.

2.2.3. Для удаления теста следует выбрать его название в списке и нажать кнопку **Удалить**.

2.2.4. Для выхода из настроек следует нажать кнопку **Отмена** (выход БЕЗ учета внесенных изменений) или **Ок** (выход с учетом внесенных изменений).

Внимание! Внесенные настройки сохраняются только при выходе из программы, о чем она выдает запрос при завершении работы.

2.3. «Нумерация пробирок» позволяет задать наиболее удобный и привычный для оператора способ идентификации пробирок, который будет использован как в протоколе, так и при выводе программой сообщений во время детекции результатов.

3. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Формат «Флуоропол», комплектация «Нераскапанные».

3.1.1. Приготовить и пронумеровать бесцветные пробирки вместимостью 0,5 или 0,2 мл (согласно инструкции к прибору) для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК, отрицательного контрольного образца и, при необходимости, фоновые пробирки. Для детекции результата реакции в конечной точке возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C.

3.1.2. За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

3.1.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 и тщательно перемешать пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или вортексированием.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Разбавитель, мкл	15	75	150	300	750	1500
5х реакционная смесь, мкл	5	25	50	100	250	500
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000

3.1.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести по 20 мкл рабочей смеси.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000
Taq-полимераза, мкл	0,2	1	2	4	10	20

3.1.5. В оставшуюся рабочую смесь внести Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющийся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или вортексированием.

3.1.6. Внести в приготовленные пробирки, кроме фоновых, по 20 мкл полученной рабочей смеси.

3.1.7. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.

3.1.8. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

а) фоновые пробирки - при выделении ДНК из образцов неокрашенным реагентом «ДНК-экспресс» в фоновые пробирки вносится разбавитель. В других случаях вносится реагент, в котором растворена ДНК исследуемых образцов, например, буфер TE, деионизованная вода или др. реагенты;

б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

3.1.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250 – 4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

3.2. Формат «One Step». Формат «Флуоропол», комплектация «One Step».

3.2.1. Достать пробирки с амплификационной и фоновой смесями, положительным контролем и разбавителем из холодильника в соответствии с количеством анализируемых образцов и промаркировать их.

3.2.2. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

в) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Внимание! Пробирки фоновых образцов (маркировка «ФОН») полностью готовы к термоциклированию. Добавление в них каких-либо реагентов недопустимо! Возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

3.2.3. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

3.3. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по одной из следующих программ:

Программа для обнаружения возбудителей *Bacteroides spp.*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr virus*, *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex virus 1+2*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, *Human papilloma virus 16+18*, *Human papilloma virus 16*, *Human papilloma virus 18*, *Human papilloma virus 6+11*, *Human papilloma virus 31+33*, *Mobiluncus curtisii*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma spp.*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* u *Enterococcus faecium*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Corynebacterium diptheriae*, *Listeria spp.*, *Mycobacterium (tuberculosis+bovis)*, резистентности *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином, резистентности *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином.:


+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	35 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

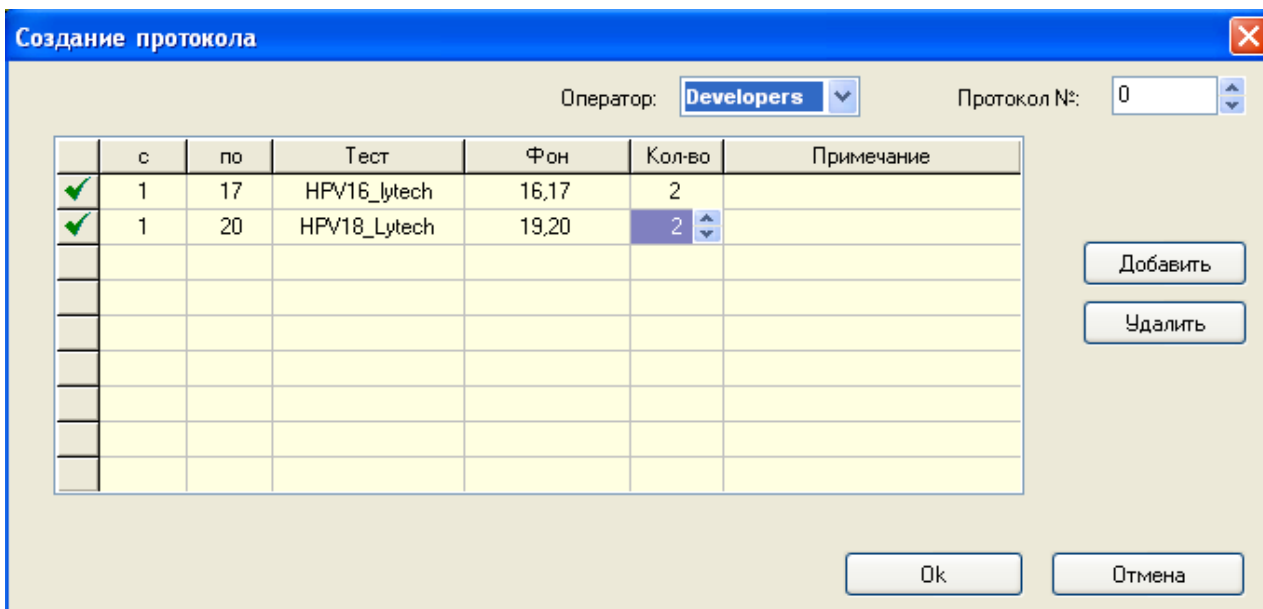
Программа для обнаружения *Lactobacillus spp.*:

+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	30 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ.

4. СОЗДАНИЕ ПРОТОКОЛА ИЗМЕРЕНИЙ.


4.1. Нажать кнопку  на панели инструментов в основном окне управляющей программы или выбрать пункт **Создать** из меню **Протокол**. Программа перейдет в окно создания протокола измерений.



4.2. В поле **Оператор:** выбирать имя оператора, а в поле **Протокол №:** - номер протокола (после первого введения ненулевого номера программа автоматически начнет предлагать номер следующего протокола).

Важно помнить, что для каждого теста в рамках протокола создается своя строка.

4.3. В столбце «с» ввести номер первой, а в столбце «по» - последней измеряемой пробирки.

4.4. В столбце **Тест** выбрать возбудителя (список открывается при нажатии на кнопку , появляющуюся в выбранном поле), для которого будет проведено измерение.

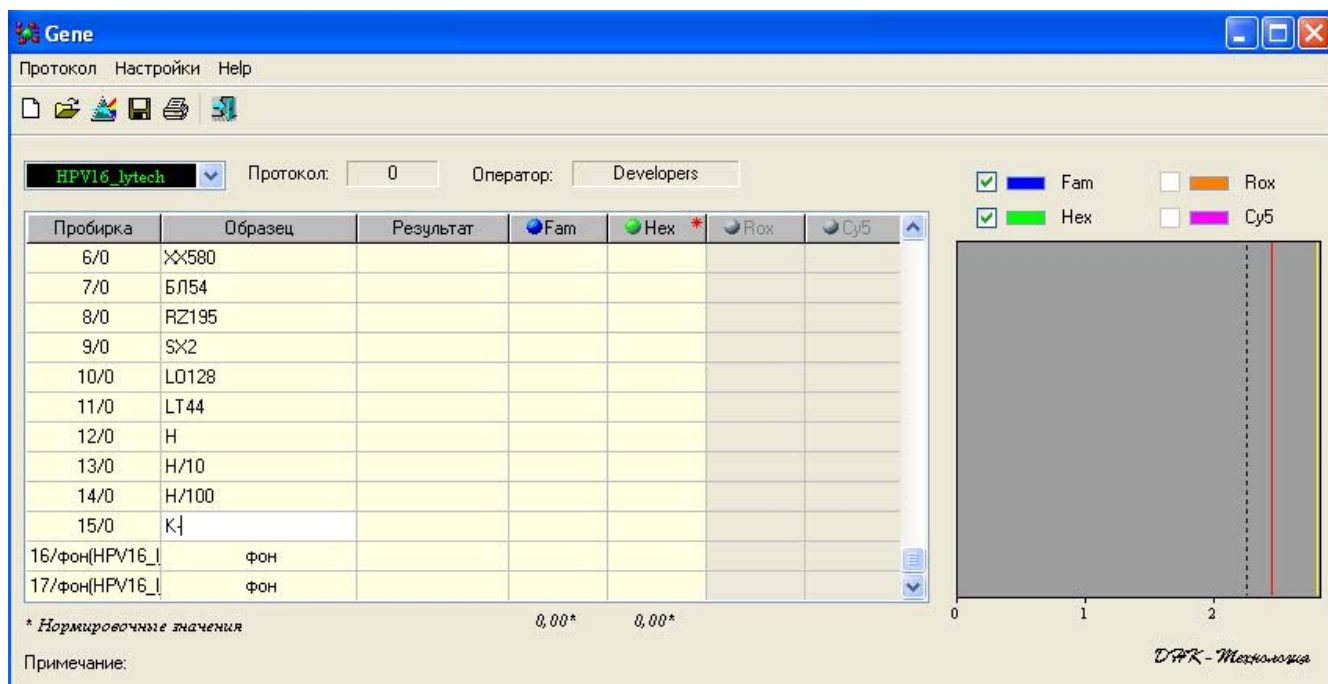
4.5. В столбце **Кол-во** указать количество фоновых пробирок. По умолчанию используется значение 2 (рекомендуется использовать именно его), однако оно может быть изменено. Число фоновых пробирок не может быть меньше 1 и более, чем общее число пробирок в тесте минус одна. В окне Фон отображаются номера фоновых пробирок (они всегда идут последними в каждом тесте).


4.6. В столбце **Примечание** можно ввести комментарий к тесту.

4.7. Для добавления новой строки следует нажать кнопку **Добавить** или просто перейти на следующую. Добавление новой строки до заполнения поля **Тест** текущей строки НЕВОЗМОЖНО.

4.8. Для удаления строки следует сделать активным (выделенным синим) какое-либо ее поле и нажать кнопку **Удалить**, а затем нажать кнопку **Да** в появившемся окне.

4.9. Для завершения работы с окном следует нажать кнопку **Отмена** (протокол создан НЕ БУДЕТ) или **Ok** и продолжить заполнение протокола в основном окне программы.




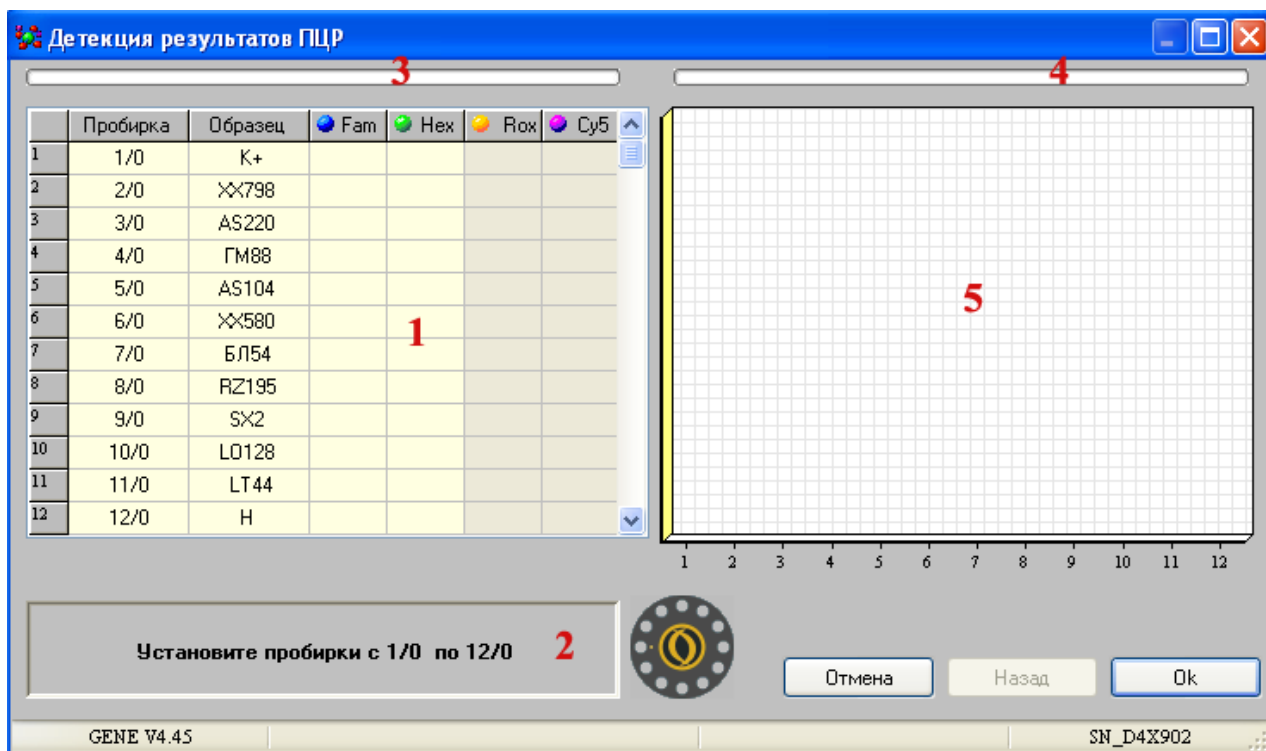
4.10. Рекомендуется внести названия всех образцов в поля столбца **Образец** (название «фон» для фоновых пробирок вносится программой автоматически) для всех внесенных в протокол тестов. Название теста отображается зеленым цветом в черном поле в левой верхней части окна. Для перехода к другим тестам следует раскрыть их список нажатием на кнопку  в правой части поля.

Внимание! Протокол, по которому не были проведены измерения, не может быть сохранен. Закрытие программы, создание нового или открытие ранее сохраненного протокола уничтожат текущий протокол.

5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Для проведения детекции ПЦР-детектор должен быть включен.

5.1. Для перехода в режим измерения следует нажать кнопку  на панели инструментов основного окна программы, либо выбрать пункт **Детекция** в меню **Протокол**. Программа выведет окно проведения измерений.



5.2. Окно проведения измерений имеет следующую структуру:

- В поле **1** выводится информация о последовательности анализируемых в данном цикле пробирок. Во время измерений в этом же окне выводятся численные значения интенсивности специфического сигнала от FAM и/или Rox (столбец Специфика) и сигнала от внутреннего контроля от HEX (столбец ВК) в единицах флуоресценции детектора Джин-4. Эти данные еще не прошли нормировку на уровень фона, поэтому анализу не подлежат;
- В поле **2** программа выдает сообщения для оператора, согласно которым проводятся измерения;
- Нажатием на кнопку **Ok** оператор подтверждает, что он ознакомился с текстом выданного программой сообщения, принял полученные данные к сведению, выполнил рекомендуемые программой действия и подтверждает переход к следующему шагу измерений.
- Каждое нажатие на кнопку **Назад** возвращает программу к состоянию на момент окончания предыдущего цикла измерений (если нажатие было произведено после первого цикла – к началу измерений). При нажатии на эту кнопку, программа запрашивает подтверждение, поскольку данные, полученные в текущем цикле, будут утеряны;
- Индикаторы прогресса **3** и **4** отображают, насколько завершено измерение протокола в целом (индикатор **3**) и текущего цикла (индикатор **4**);
- В окне **5** в виде столбчатой диаграммы отображаются интенсивности специфического сигнала от FAM (синие столбцы), Rox (оранжевые столбцы), Cy5 (фиолетовые столбцы) и сигнала от внутреннего контроля от HEX

(зеленые столбцы) в единицах флуоресценции детектора Джин-4. Эти данные еще не прошли нормировку на уровень фона, поэтому анализу не подлежат;

- Выход из режима измерений без принятия значений сигнала осуществляется кнопкой **Отмена** (прибор потребует подтверждения).

Примечание: кнопки являются активными (черный текст) только в тех случаях, когда программа может выполнить обозначаемое кнопкой в данный момент действие.

Часть информации из окна дублируется на ЖК-дисплее ПЦР-детектора. Подробнее см. инструкцию к прибору.

5.3. Установка пробирок в прибор:

5.3.1. Установка пробирок в ПЦР-детектор осуществляется по требованию управляющей программы в указанном в поле 1 окна измерений порядке. Диапазон пробирок указанный в соответствующем сообщении в поле 2 устанавливается полностью вне зависимости от того, принадлежат пробирки одному тесту или разным. Первая пробирка диапазона должна быть установлена строго в ячейку №1 барабана детектора, вторая – в ячейку №2 и т.д.

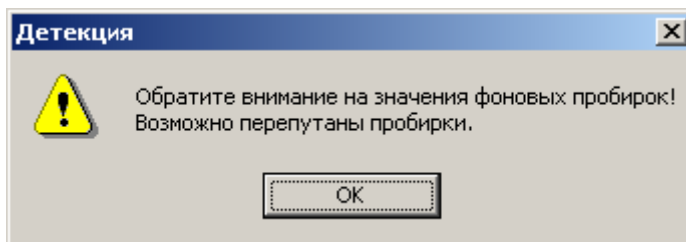
5.3.2. Перед установкой каждую пробирку следует осмотреть на наличие мешающих считыванию результата факторов (и при обнаружении устранить их):

- *содержимое пробирки полностью или частично разбрызгано по стенкам* - центрифугировать пробирку в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе;
- *пузырек воздуха* – удалить постукиванием по пробирке твердым не загрязняющим поверхность предметом (ногтем) и центрифугировать в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе;
- *наличие видимых загрязнений на дне или конической части пробирки* – удалить путем протирания чистым безворсовым материалом.

5.3.3. Пробирки устанавливать в ячейки барабана до упора, но не прикладывая излишних усилий. Ориентация петли и выступа крышки пробирки значения не имеет, если не мешает корректной установке других пробирок.

5.4. Проведение измерений проводится в соответствии с сообщениями программы. После выполнения всех ее требований в данном шаге переход к следующему осуществляется нажатием кнопки **Ok** в окне измерений. При необходимости можно повторить один или несколько циклов измерений, вернувшись к концу предыдущего цикла (началу измерений протокола) кнопкой **Назад**.

Следует внимательно анализировать выдаваемые сообщения и принимать требуемые меры. В случае возникновения сообщения




следует проверить правильность установки и отсутствие факторов мешающих прочтению фоновых пробирок (см. п. 5.3.2.). Если причина ошибки выявлена, следует устранить ее и повторить измерения. Если выявить причину ошибки не удастся, а подобная же ошибка повторяется при повторных измерениях, следует:

- если фоновые пробирки делались в анализируемой постановке – полностью повторить постановку;
- если фоновые пробирки были сделаны ранее – переделать их и повторить измерение постановки с новыми (**анализируемые пробирки могут быть сохранены при +2...+8°C в течение суток**).

5.5. По завершении измерений после возврата в главное окно программы протокол необходимо сохранить. Для

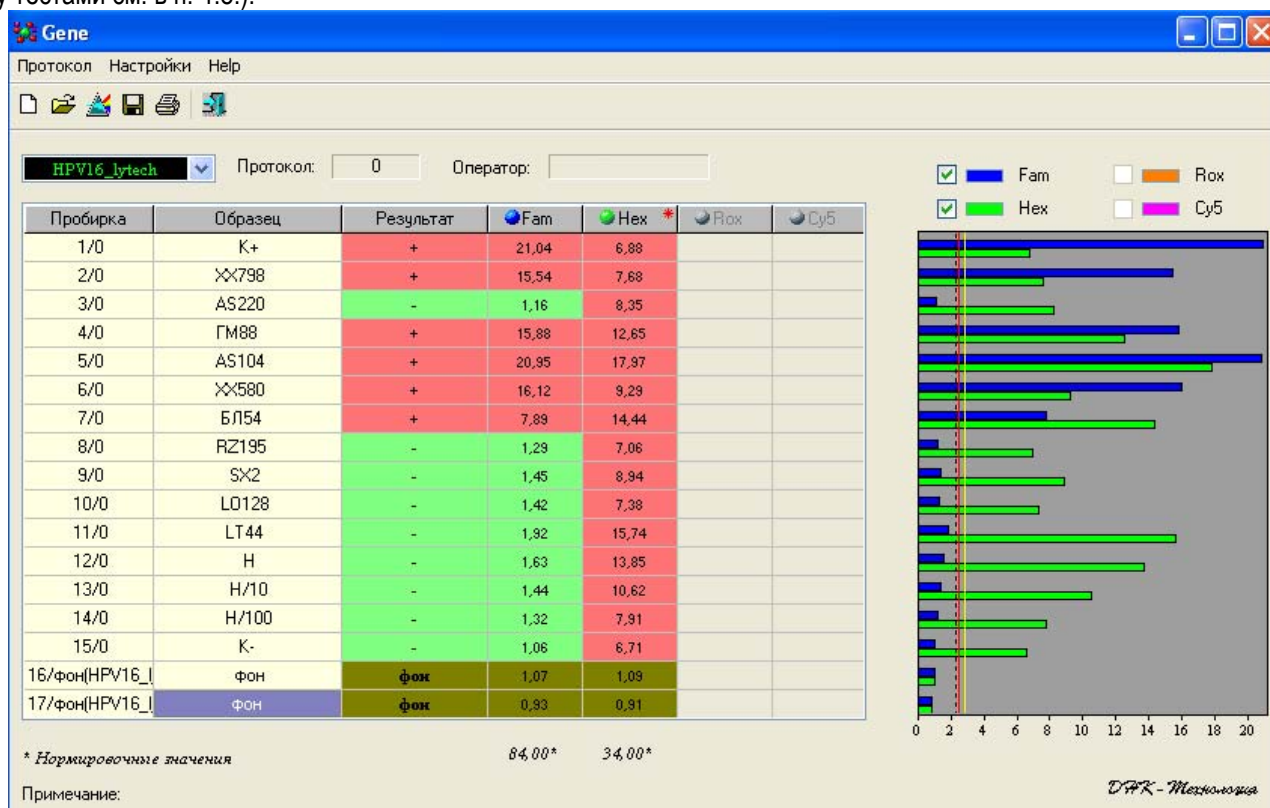


этого следует нажать кнопку  на панели инструментов или выбрать пункт **Сохранить ...** в меню **Протокол**. По умолчанию программа предложит сохранить протокол в личной папке оператора, проводившего съемку в виде файла с названием «**Протокол №<номер протокола> <дата измерения>**». Протокол сохраняется с результатами анализа (см. п. 6.1.).

5.6. При необходимости можно повторить детекцию результатов по тому же протоколу, если после измерения не создавался и не загружался другой протокол. Для этого повторите все действия, описанные в разделе 5.

6. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1. Нормировка сигнала от каждого канала на усредненный сигнал в соответствующем канале от фоновых пробирок и анализ результатов проводится программой автоматически для каждой пробирки после завершения измерений по протоколу. Результаты выводятся в главном окне программы для каждого теста отдельно (перехода между тестами см. в п. 4.8.):



- В столбце **Результат** выводится качественный результат анализа, определенный на основе сравнения полученных после нормировки значений сигнала с пороговыми.
- В столбцах **FAM**, **HEX**, **Rox** и **Cy5** выводятся численные значения сигнала в соответствующих каналах, нормированные на фон (усредненный фон принимается равным 1, нормировочные коэффициенты для каждого канала выводятся под соответствующим столбцом). Те же значения в графическом виде представлены на диаграмме в правой части окна. При использовании двух каналов красная линия на ней соответствует пороговому значению «-», желтая – «+» для спецификации, пунктирная черная – «ВК». При использовании трёх и более каналов пороговые линии не отображаются.

6.2. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей:


	Результат	Специфика*	ВК*	Интерпретация
K+	+	Сигнал > «+»	любой	Реакция прошла
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Реакция не прошла.
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	НЕОБХОДИМА перестановка
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	
K-	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Контаминация отсутствует
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
	+	Сигнал > «+»	любой	Специфическая контаминация.
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	НЕОБХОДИМА перестановка.
Анализируемый образец	+	Сигнал > «+»	любой	Положительная проба
	-	Сигнал < «-»	Сигнал > «ВК»	Отрицательная проба
	?	«-» < Сигнал < «+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	нд	Сигнал < «-»	Сигнал < «ВК»	Недостовверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
фон	фон	Не интерпретируется.		


* Сигнал соответствующего канала сравнивается со следующими пороговыми значениями:

- для специфического сигнала (Специфика) – положительным «+» и отрицательным «-» пороговыми значениями;
- для внутреннего контроля (ВК) – с пороговым значением внутреннего контроля «ВК».

Примечание: при возникновении сомнительных или недостоверных результатов, а также сообщений о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок следует проверить порядок расстановки пробирок в детекторе, а также сами пробирки на присутствие мешающих детекции факторов (см. п. 5.3.) и при их отсутствии еще 2 раза повторить детекцию. **Корректным считать результат, зарегистрированный не менее чем в 2 измерениях из 3.**

7. РАБОТА С СОХРАНЕННЫМ ПРОТОКОЛОМ

7.1. Для загрузки сохраненного ранее протокола следует нажать кнопку  или выбрать пункт **Открыть...** в меню **Протокол**.

7.2. Для печати протокола следует нажать кнопку  или выбрать пункт **Печать ...** в меню **Протокол**. Протокол печатается полностью, таблицы результатов всех тестов идут в том порядке, в котором они указаны в протоколе!

7.3. Протокол может быть экспортирован в виде файла формата Excel. Для этого следует выбрать пункт **Сохранить как ...** в меню **Протокол**.

Внимание! Такие файлы не могут быть загружены обратно в управляющую программу, поэтому экспорт следует проводить только после сохранения протокола!

Проведение ПЦР с детекцией результата в конечной точке реакции при помощи мультиканального автоматического люминесцентного анализатора «АЛА-1/4» (НПФ «BioSan»)

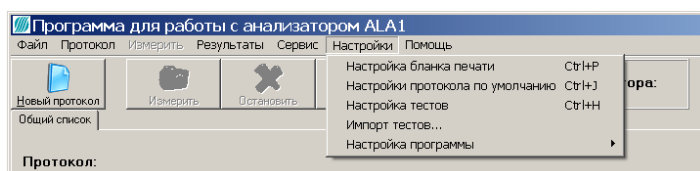
1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Мультиканальный автоматический люминесцентный анализатор «АЛА-1/4» предназначен для регистрации флуоресцентного сигнала от образцов, прошедших амплификацию с флуоресцентными зондами. Образцы должны находиться в бесцветных пробирках объемом 0,5 мл или 0,2 мл. ПЦР проводится в амплификаторах, рассчитанных на работу со стандартными пробирками объемом 0,5 мл или 0,2 мл. Детектор регистрирует сигнал по четырём каналам: флуорофоры FAM, ROX, HEX, CY5. По завершении измерений управляющая программа нормирует сигнал от каждого канала на усредненный сигнал в соответствующем канале от фоновых пробирок. Именно это соотношение сигнал/фон (усредненный фон приравнивается 1) выдается в протокол и используется программой при анализе результатов. Анализ результатов измерений проводится программой автоматически сразу же после завершения измерений согласно прописанным в ее базе пороговым значениям.

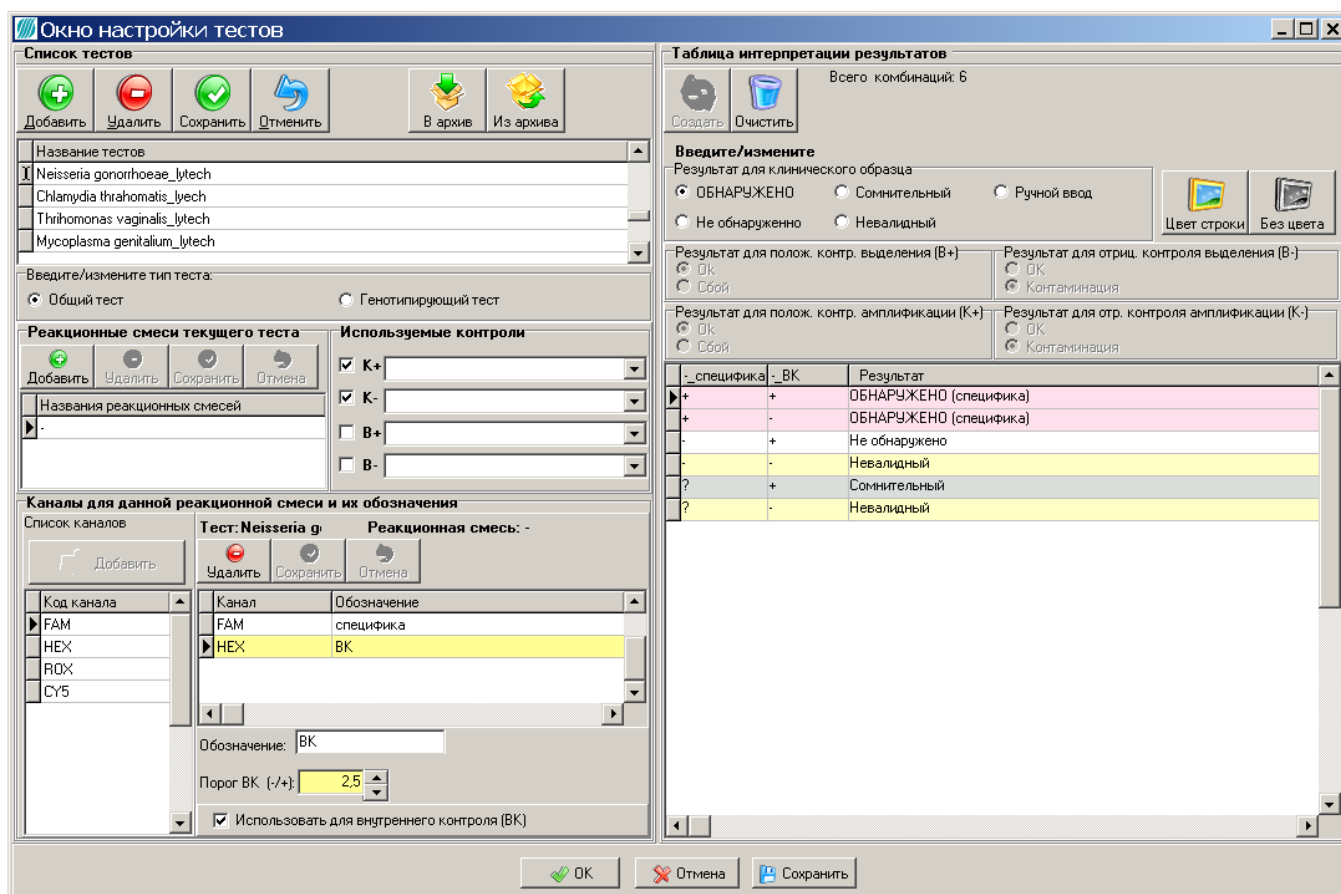
В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами ФЛУОРОПОЛ. Все цвета указаны для принятого по умолчанию оформления результатов. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ. Настройки теста. Тест-система.

2.1. Просмотр параметров существующих тест-систем производится из меню Настройки/Настройка тестов.

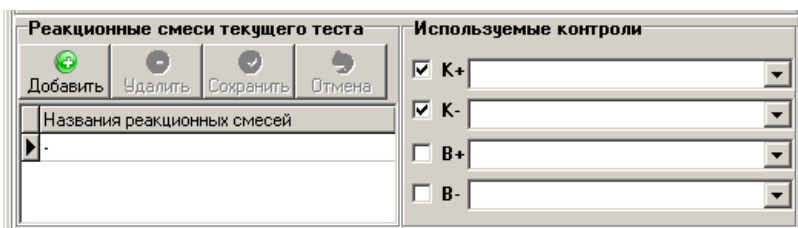
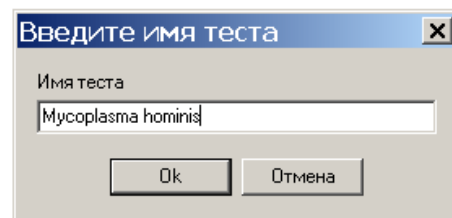


В окне «Окно настройки тестов» предоставляется возможность просмотра, изменения, удаления и создания теста с соответствующими настройками параметров автоматического учета результатов, которые отвечают параметрам данного теста (тест-системы).



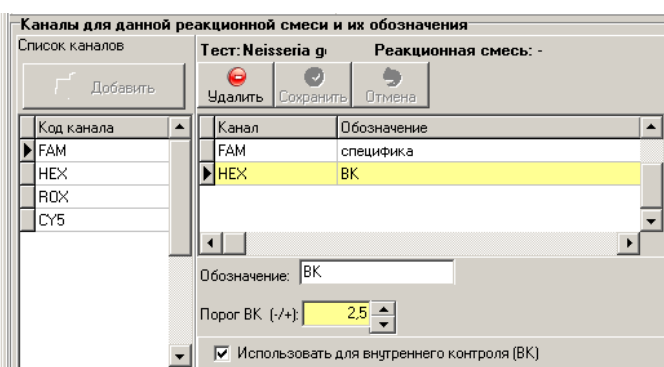
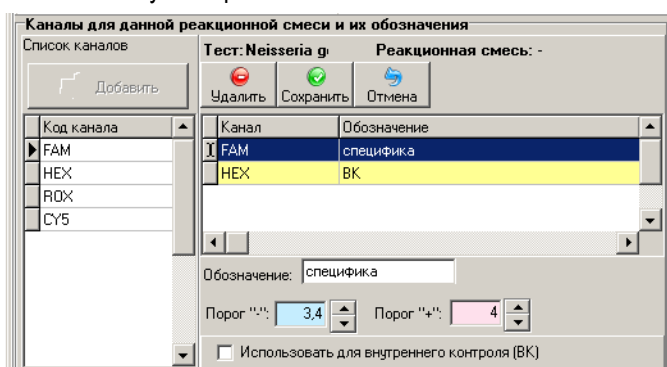
В поле *Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения* представлены задействованные каналы для детекции результатов теста и внутреннего контрольного образца и их обозначения. В полях Порог «-» и Порог «+» устанавливаются пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической ДНК, а в поле Порог ВК (-/+) задается пороговое значение отношения сигнала к фону по каналу для детекции ВКО.

2.2. Для наборов ФЛУОРОПОЛ и ФЛУОРОПЛЕКС следует создать новые тесты. Для этого в окне «Окно настройки тестов» в поле *Список тестов* нажать кнопку «Добавить» в верхней части окна, после чего в появившемся окне «Введите имя теста» ввести Имя теста и нажать кнопку «ОК». Выбрать тип теста «Общий тест» или «Генотипирующий тест». По умолчанию название реакционной смеси обозначается прочерком, меняется название щелчком левой кнопки мыши. В поле *Используемые контроли* отметить галочками «К+» и «К-».



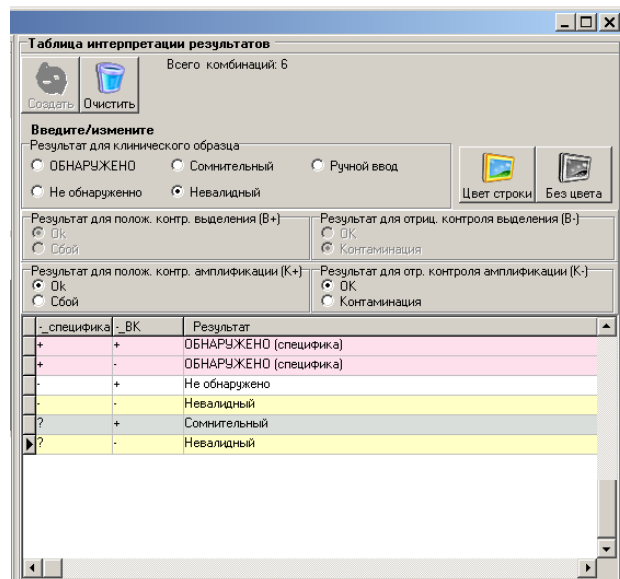
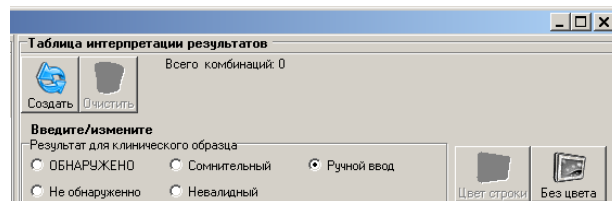
В поле *Каналы* для данной реакционной смеси и их обозначения из *Списка каналов* выбрать необходимый код канала и нажать кнопку «Добавить». Для детекции специфического сигнала используются FAM и ROX в случае наборов с тремя красителями, для внутреннего контрольного образца – HEX. Список

добавленных каналов отображается в таблице справа. Для каналов FAM и ROX задать пороговые значения в полях Порог «-» и Порог «+» и нажать кнопку «Сохранить», обозначение канала может быть произвольным. Для канала HEX отметить галочку «Использовать для внутреннего контроля (VK)» и задать пороговое значение в поле Порог VK (-/+) и нажать кнопку «Сохранить».



В поле *Таблица и интерпретации результатов* нажать кнопку «Создать». Программа автоматически создаёт все варианты комбинации результатов по всем каналам детекции для всех реакционных смесей, и все варианты интерпретации используемых контролей. Если тип теста «Общий» то при интерпретации результата как «Обнаружено» в скобках перечисляется что именно обнаружено согласно обозначениям по каналам спецификации. Если тип теста «Генотипирующий» то при интерпретации результатов как «Обнаружено» совместно с отображением что именно обнаружено (согласно обозначениям по каналам спецификации) одновременно отображается результат «Сомнительно» (согласно обозначениям по каналам спецификации).

После введения всех параметров нажать кнопку «Ок» или «Сохранить» в нижней части окна «Настройка тестов». Для удаления теста следует выбрать его название в поле *Список тестов* и нажать кнопку «Удалить» в верхней части окна. Для редактирования теста следует выбрать его название в поле *Список тестов*, внести необходимые изменения параметров, очистить таблицу интерпретации результатов нажав кнопку «Очистить» и снова создать шаблон таблицы интерпретации результатов.



Для наборов ФЛУОРОПОЛ и ФЛУОРОПЛЕКС следует выставлять следующие пороговые значения:

Возбудитель	Канал	Порог -	Порог +
Внутренний контроль	HEX	2,5	
<i>Atopobium vaginae</i>	FAM	3,2	3,6
<i>Bacteroides spp.</i>	FAM	4,5	5,5
<i>Candida albicans</i>	FAM	3,5	4,2
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	FAM	2,7	3,1
<i>Chlamydia trachomatis</i>	FAM	3,2	3,6
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	FAM	2,3	2,6
<i>Cytomegalovirus</i>	FAM	2,8	3,1
<i>Escherichia coli</i>	FAM	3,3	3,6
<i>Enterococcus faecalis</i> u <i>Enterococcus faecium</i>	FAM	2,5	3,0
<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	FAM	2,7	3,0
<i>Epstein-Barr virus</i>	FAM	2,4	2,7
<i>Gardnerella vaginalis</i>	FAM	12,7	13,9
<i>Herpes simplex virus 1**</i>	FAM	2,6	3,0
<i>Herpes simplex virus 1+2*</i>	FAM	2,3	2,6
<i>Herpes simplex virus 2**</i>	FAM	2,2	2,6
<i>Human papilloma virus 16**</i>	FAM	3,6	4,2
<i>Human papilloma virus 16+18*</i>	FAM	2,9	3,4
<i>Human papilloma virus 16+18**</i>	FAM (16)	4,9	5,4
	ROX (18)	1,6	1,8
<i>Human papilloma virus 18**</i>	FAM	2,6	3,0
<i>Human papilloma virus 6+11*</i>	FAM	2,6	2,8
<i>Human papilloma virus 6+11**</i>	FAM (6)	4,0	4,4
	ROX (11)	1,4	1,6
<i>Human papilloma virus 31+33*</i>	FAM	2,2	2,4
<i>Lactobacillus spp.</i>	FAM	5,7	6,2
<i>Listeria spp.</i>	FAM	2,2	2,5
<i>Mobiluncus curtisii</i>	FAM	4,3	5,3
<i>Mycobacterium (tuberculosis+bovis)</i>	FAM	2,8	3,2
<i>Mycoplasma genitalium</i>	FAM	2,0	2,3
<i>Mycoplasma hominis</i>	FAM	2,8	3,2
<i>Neisseria gonorrhoeae*</i>	FAM	3,4	4,0
<i>Proteus spp.</i>	FAM	2,9	3,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	3,1	3,6
<i>Serratia spp.</i>	FAM	3,5	3,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	FAM	3,2	3,8
<i>Streptococcus spp.</i>	FAM	2,2	2,5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	2,7	3,2
<i>Toxoplasma gondii</i>	FAM	3,5	4,1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	4,5	5,3
<i>Ureaplasma spp.</i>	FAM	4,1	4,8
<i>Ureaplasma parvum</i>	FAM	3,2	4,1
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	FAM	4,4	5,4
Резистентность <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспорином	FAM	2,5	2,8
Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспорином	FAM	2,4	2,8
ФЛУОРОПЛЕКС <i>Chlamydia trachomatis</i> u <i>Mycoplasma hominis**</i>	FAM (Chl.tr.)	2,7	3,2
	ROX (M.hom.)	1,3	1,5
ФЛУОРОПЛЕКС <i>Neisseria gonorrhoeae</i> u <i>Trichomonas vaginalis**</i>	FAM (N.gon.)	3,4	4,0
	ROX (Trich.vag.)	2,4	3,0

* Наборы реагентов без конкретизации типа.

** Типоспецифичные наборы.

3. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Формат «Флуоропол», комплектация «Нераскапанные».

3.1.1. Приготовить и пронумеровать бесцветные пробирки вместимостью 0,5 мл или 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК, отрицательного контрольного образца и, при необходимости, фоновые пробирки. Для детекции результата реакции в конечной точке возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C.

3.1.2. За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

3.1.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 и тщательно перемешать пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или вортексированием.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Разбавитель, мкл	15	75	150	300	750	1500
5x реакционная смесь, мкл	5	25	50	100	250	500
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000

3.1.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести по 20 мкл рабочей смеси.

3.1.5. В оставшуюся рабочую смесь внести Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющийся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или вортексированием.

Число пробирок	1	5	10	20	50	100
Объем рабочей смеси, мкл	20	100	200	400	1000	2000
Taq-полимераза, мкл	0,2	1	2	4	10	20

3.1.6. Внести в приготовленные пробирки кроме фоновых, по 20 мкл полученной рабочей смеси.

3.1.7. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.

3.1.8. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

а) в фоновые пробирки - при выделении ДНК из образцов неокрашенным реагентом «ДНК-экспресс» в фоновые пробирки вносится разбавитель. В других случаях вносится реагент, в котором растворена ДНК исследуемых образцов, например, буфер TE, деионизованная вода или др. реагенты;

б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

3.1.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

3.2. Формат «Флуоропол», комплектация «One Step».

3.2.1. Достать пробирки с амплификационной и фоновой смесями, положительным контролем и разбавителем из холодильника в соответствии с количеством анализируемых образцов и промаркировать их.

3.2.2. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

в) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

Внимание! Пробирки фоновых образцов (маркировка «ФОН») полностью готовы к термоциклированию. Добавление в них каких-либо реагентов недопустимо! возможно неоднократное применение однократно оттермоциклированных фоновых пробирок без дополнительных манипуляций по крайней мере в течение недели с промежуточным хранением при +2...+8°C.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

3.2.3. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе.

3.3. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по одной из следующих программ:

Программа для обнаружения возбудителей *Bacteroides spp.*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Cytomegalovirus*, *Gardnerella vaginalis*, *Epstein-Barr virus*, *Herpes simplex virus 1+2*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, *Human papilloma virus 16+18*, *Human papilloma virus 16*, *Human papilloma virus 18*, *Human papilloma virus 6+11*, *Human papilloma virus 31+33*, *Mobiluncus curtisii*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma spp.*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* u *Enterococcus faecium*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria spp.*, *Mycobacterium (tuberculosis+bovis)*, резистентности *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином, резистентности *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином, *Chlamydia trachomatis*+*Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*+*Trichomonas vaginalis*.

+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	35 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

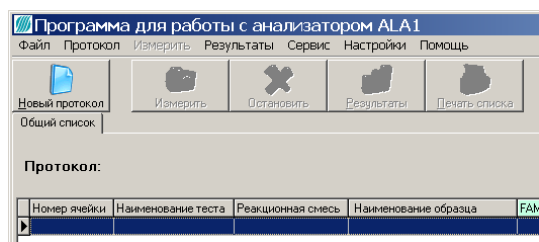
Программа для обнаружения *Lactobacillus spp.*:

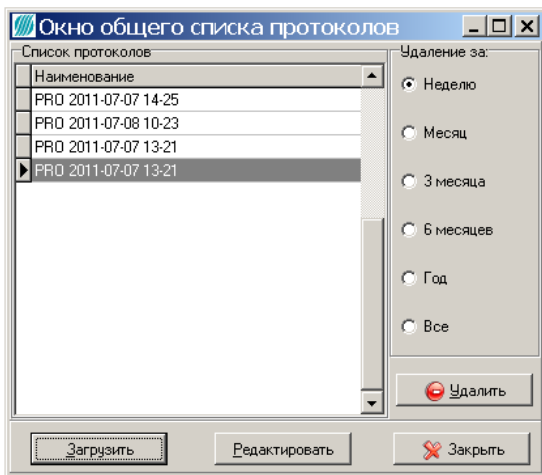
+94 °C	Пауза	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	5 сек	30 циклов
+64 °C	30 сек	
+10 °C	Сохранение	

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ.

4. СОЗДАНИЕ ПРОТОКОЛА ИЗМЕРЕНИЙ.

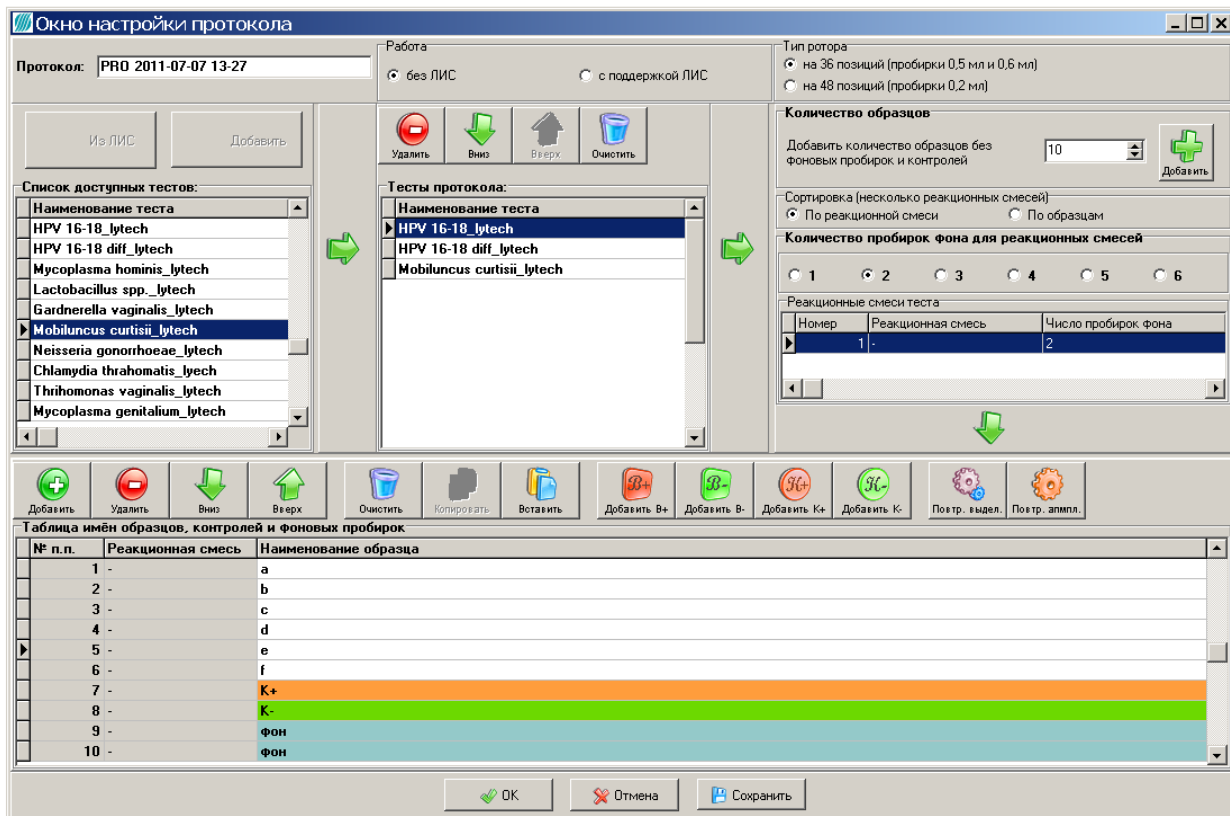
4.1. Для проведения анализа необходимо открыть существующий или создать новый протокол. Для создания протокола следует выбрать в меню пункт *Протокол*, затем *Новый протокол* или нажать кнопку «Новый протокол» в основном окне программы. Для открытия существующего протокола следует выбрать в меню пункт *Протокол/Открыть* и загрузить протокол из *Списка протоколов*.





4.2. В окне «Окно настройки протокола» выбрать Наименование теста из *Списка доступных тестов* и нажать кнопку «Добавить». В поле *Тип ротора* выбрать используемый тип ротора. Для выбранного теста задать количество тестируемых клинических образцов, **без учёта количества фоновых пробирок и контролей**. Для этого ввести необходимое значение в поле *Количество образцов*. Нажать кнопку «Добавить». Образцы добавляются списком в *Таблицу имён образцов и фоновых пробирок*. Выбрать необходимое количество фоновых пробирок, переключением на соответствующую группу. В таблице имён образцов задать обозначения для каждого образца. Добавить необходимое количество контролей, используя кнопки «Добавить K+» и «Добавить K-». Контрольные пробирки добавляются в таблицу ниже строки, в которую установлен курсор. Редактировать количество и последовательность образцов можно, используя

кнопки «Добавить», «Удалить», «Вверх» и «Вниз». Если тестов для исследования необходимо задать несколько, то необходимо повторить вышеперечисленные пункты. Сохранить протокол нажатием на кнопку «ОК». Для редактирования существующего протокола следует выбрать в меню пункт *Протокол/Открыть*, выбрать протокол из списка и нажать кнопку «Редактировать». В появившемся окне Окно настройки протокола внести необходимые изменения и «Сохранить» под текущим или новым именем.

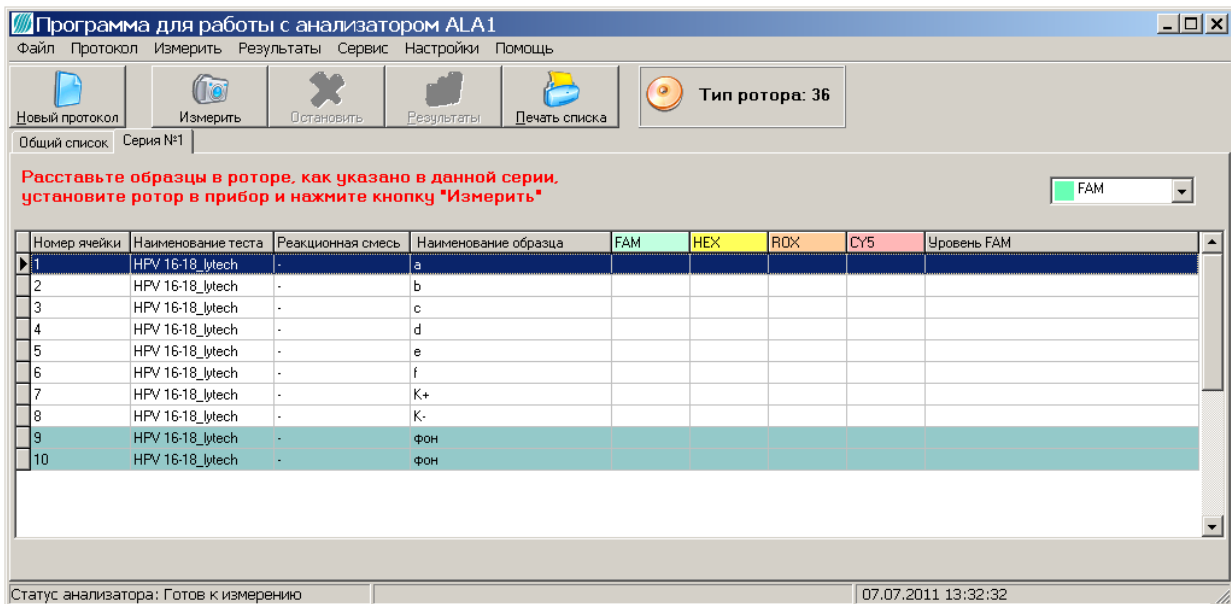


5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

5.1. Последовательность измерения образцов по сериям можно увидеть в основном окне программы. Если количество образцов для измерения больше 36 или 48 (в зависимости от используемого типа ротора) происходит разбиение по сериям из 36 или 48 образцов. Следует расставить образцы в роторе как указано в данной серии, установить ротор в прибор и нажать кнопку «Измерить» текущую серию на панели задач программы. Появится сообщение об измерении текущей серии, нажать кнопку «Да». Во время детекции появляется окно с указанием в % от оставшегося объема работы с данной серией образцов. После измерения серии, программа автоматически переключается на следующую серию. Следует извлечь пробирки из ротора, загрузить пробирки, соответствующие следующей серии и нажать кнопку «Измерить».

5.2. После проведения детекции результаты автоматического учета будут представлены в таблице. Следует сохранить результаты как файл результатов, нажав кнопку «Сохранить» на панели задач окна «Окно результатов».





5.3. Установка пробирок в прибор:

Перед установкой каждую пробирку следует осмотреть на наличие мешающих считыванию результата факторов (и при обнаружении устранить их):

содержимое пробирки полностью или частично разбрызгано по стенкам - центрифугировать пробирку в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе;

пузырек воздуха – удалить постукиванием по пробирке твердым не загрязняющим поверхность предметом (ногтем) и центрифугировать в течение 15 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при температуре +16...+25°C на микроцентрифуге-вортексе;

наличие видимых загрязнений на дне или конической части пробирки – удалить путем протирания чистым безворсовым материалом.

Пробирки устанавливать в ячейки барабана до упора, но не прикладывая излишних усилий. Ориентация петли и выступа крышки пробирки значения не имеет, если не мешает корректной установке других пробирок.

6. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1. Для тестов ФЛУОРОПОЛ и ФЛУОРОПЛЕКС в колонке *Результат* выводятся данные по каналам спецификации FAM (ROX) для клинических образцов согласно его обозначению в настройках теста и по каналу HEX для положительного и отрицательного контролей. Обращаем внимание, что поскольку внутренний контроль в наборах сделан на человеческую ДНК, которая выделяется при обработке клинических образцов, то сигнала внутреннего контроля в пробирках с отрицательным, положительным контролями и стандартными образцами НЕ должно быть. Если же внутренний контроль все же детектируется в указанных образцах, это свидетельствует о контаминации рабочего места человеческой ДНК, что на результаты опыта по выявлению возбудителей НЕ влияет (см. далее).

Наименование теста	Наименование образца	Позиции в серии	Результат	ФИО	Печать	Примечание
HPV 16-18 diff_lytech	3а	S1-20	ОБНАРУЖЕНО (HPV16)		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	3б	S1-21	ОБНАРУЖЕНО (HPV16)		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	3в	S1-22	ОБНАРУЖЕНО (HPV16)		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	3г	S1-23	ОБНАРУЖЕНО (HPV16)		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	3д	S1-24	ОБНАРУЖЕНО (HPV18)		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	3е	S1-25	ОБНАРУЖЕНО (HPV18)		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	3ж	S1-26	Не обнаружено		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	3з	S1-27	Не обнаружено		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	K+16	S1-28	OK		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	K+18	S1-29	OK		<input checked="" type="checkbox"/>	
HPV 16-18 diff_lytech	K-	S1-30	OK		<input checked="" type="checkbox"/>	

6.2. Нормировка сигнала от каждого канала на усредненный сигнал в соответствующем канале от фоновых пробирок и анализ результатов проводится программой автоматически для каждой пробирки после завершения измерений по протоколу.

Результаты измерений для клинических образцов в выводимой таблице представляются с помощью следующих обозначений:

обнаружено	<i>Положительный результат</i> Если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК выше значения Порог + , то результат интерпретируется как положительный
не обнаружено	<i>Отрицательный результат</i> Если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК ниже значения Порог - , то результат интерпретируется как отрицательный только в том случае, если отношение сигнал/фон по каналу для детекции ВК превышает пороговое значение
невалидный	<i>Недостовверный результат (для образцов, не содержащих геномную ДНК человека – отрицательный)</i> Результат интерпретируется как недостоверный, если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК ниже значения Порог - или выше значения Порог - , но ниже значения Порог + , и при этом отношение сигнал/фон по каналу для детекции ВК ниже порогового значения
сомнительно	<i>Неопределенный результат</i> Если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК выше значения Порог - , но ниже значения Порог + (сигнал в так называемой «серой зоне»), то результат интерпретируется как «сомнительный» только в том случае, если отношение сигнал/фон по каналу для детекции ВК превышает пороговое значение

Для положительного контроля результаты представляются с помощью следующих обозначений:

Ок	Если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК выше значения Порог + , независимо от отношения сигнал/фон по каналу для детекции ВК
Сбой	Если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК ниже значения Порог - или выше значения Порог - , но ниже значения Порог +

Для отрицательного контроля результаты представляются с помощью следующих обозначений:

Ок	Если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК ниже значения Порог - , и отношение сигнал/фон по каналу для детекции ВК ниже порогового значения
Контаминация	Если отношение сигнал/фон по каналу для специфической ДНК выше значения Порог + или выше значения Порог - , но ниже значения Порог + , отношение сигнал/фон по каналу для детекции ВК при этом не превышает пороговое значение; если отношение сигнал/фон по каналу для детекции ВК превышает пороговое значение, независимо от отношения сигнал/фон по каналу для специфической ДНК

Примечание: при возникновении сомнительных или недостоверных результатов, а также сообщений о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок следует проверить порядок расстановки пробирок в детекторе, а также сами пробирки на присутствие мешающих детекции факторов (см. п. 5.3.), и при их отсутствии повторить детекцию.

6.2. Интерпретированные результаты измерений сохраняются в файле с расширением *.pre. Файл результата всегда можно открыть для просмотра с помощью меню *Результаты в основном меню/Результаты...* или с помощью кнопки «Открыть» на панели задач окна «Окно результатов».

6.2.1. Для совместной обработки полученных результатов и результатов из других файлов следует нажать кнопку «Добавить результаты» из других файлов.

6.2.2. При необходимости можно редактировать Окно результатов: вставить данные из буфера обмена кнопкой «Вставить из буфера обмена» и копировать данные из Окна результатов в буфер обмена кнопкой «Копировать в буфер обмена».

6.2.3. Вывод общей таблицы результатов на принтер производится с помощью кнопки «Печать результатов», результат для каждого пациента выводится на печать с помощью кнопки «Печать бланка».

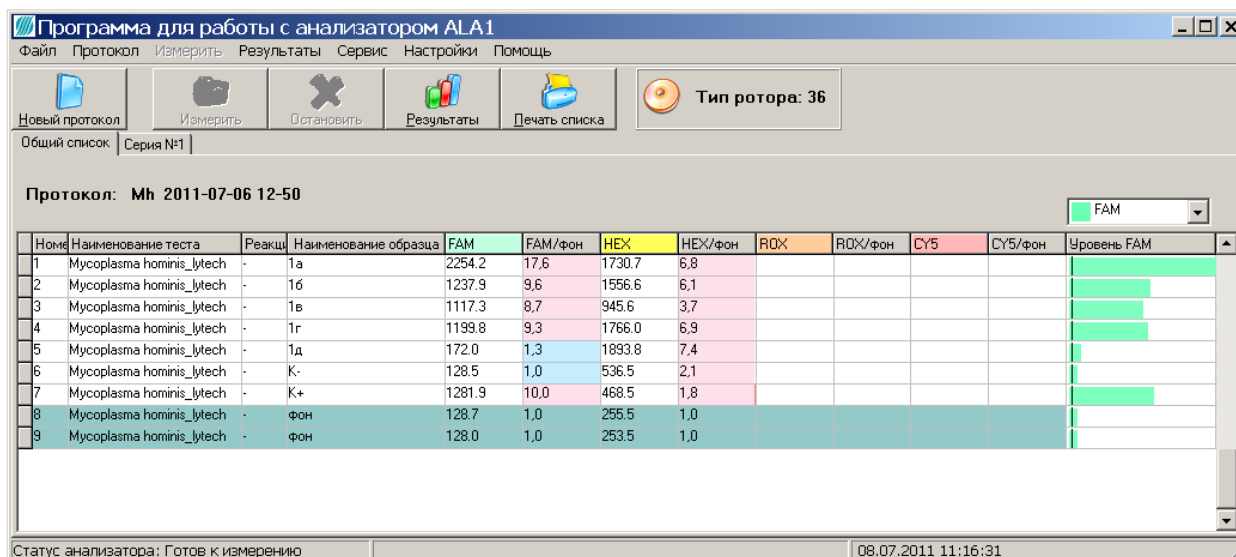
6.2.4. В программе предусмотрена возможность сохранения результатов в файл *.xls (только если установлен Microsoft Excel) для последующей обработки средствами Microsoft Excel. Для этого необходимо выбрать кнопку «Сохранить в Excel» на панели задач программы.

6.3. Исходные файлы с численными значениями интенсивности сигналов по каждому каналу и значениями сигналов, нормированными на фоновые значения, сохраняются в файле с расширением *.xml, который можно открыть для просмотра с помощью меню *Результаты в основном меню/Открыть данные измерения*.

6.3.1. Есть возможность повторно рассчитать результаты, нажав кнопку «Результаты», открывается Окно результатов.

6.3.2. Печать данных осуществляется с помощью кнопки «Печать списка».

6.3.3. При необходимости возможно сохранить исходные данные со значениями флуоресценции в формате Excel, для этого выбрать *Результаты в основном меню/Сохранить данные измерения как...*



6.4. Интерпретация результатов.

	Результат	FAM(ROX)/фон	HEX/фон	Интерпретация
К+	Ок	Сигнал > «П+»	любой	Реакция прошла
	Сбой	Сигнал < «П-» «П-» < Сигнал < «П+»	любой	Реакция не прошла. НЕОБХОДИМА перестановка
К-	Ок	Сигнал < «П-»	Сигнал < «ВК-/»	Контаминация отсутствует
	Контаминация	Сигнал < «П-»	Сигнал > «ВК-/»	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
		Сигнал > «П+» «П-» < Сигнал < «П+»	любой	Специфическая контаминация. НЕОБХОДИМА перестановка.
Анализируемый образец*	обнаружено	Сигнал > «П+»	любой	Положительная проба
	не обнаружено*	Сигнал < «П-»	Сигнал > «ВК-/»*	Отрицательная проба
	сомнительно	«П-» < Сигнал < «П+»	Сигнал > «ВК-/»	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	невалидный	Сигнал < «П-» «П-» < Сигнал < «П+»	Сигнал < «ВК-/»*	Недостовверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.*
фон	фон	Не интерпретируется.		

* **ВАЖНО ПОМНИТЬ**, что при анализе образцов, не содержащих геномную ДНК человека (стандартные образцы, образцы из культур клеток) протекание реакции на внутренний контроль невозможно. Для таких проб результат «невалидный» следует расценивать как отрицательный, а результат «не обнаружено» свидетельствует о контаминации геномной ДНК человека (в этом случае перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ).