

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 2009 г. № _____



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для обнаружения ДНК
вируса папилломы человека типов 16 и 18
методом полимеразной цепной реакции

(ФЛУОРОПОЛ 16/18)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ФЛУОРОПОЛ 16/18 предназначен для качественного обнаружения ДНК вируса папилломы человека типов 16 и/или 18 в биологическом материале (соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала) методом полимеразной цепной реакции.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2. Набор реагентов ФЛУОРОПОЛ 16/18 может быть использован в клинической диагностике носительства вируса папилломы человека типов 16 и 18, а также для оценки эффективности терапии папилломатоза.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 100 клинических образцов, 10 проб положительного контрольного образца ДНК вируса папилломы человека типов 16 и/или 18, 10 проб отрицательного контрольного образца, 10 фоновых образцов (всего 130 определений) и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «по конечной точке» реакции или «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

2.1.1. Набор реагентов ФЛУОРОПОЛ 16/18 основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК вируса папилломы человека типов 16 и/или 18 путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Постановка реакции ПЦР-амплификации.
3. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации, позволяющая проводить регистрацию продуктов амплификации ДНК-фрагмента в процессе реакции или после её завершения. Детекция

продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе. Программное обеспечение, прилагаемое к амплификатору или флуоресцентному детектору, позволяет проводить корректную обработку данных для выявления ДНК вируса папилломы человека типов 16 и 18.

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

2.2. Состав набора

В состав набора реагентов входят два комплекта:

2.2.1. Комплект для пробоподготовки (выделение ДНК):

Реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции (ДНК-ЭКСПРЕСС) - на 100 анализируемых проб.

Комплект ДНК-ЭКСПРЕСС состоит из 100 пробирок типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащих по 300 мкл реагента.

2.2.2. Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации.

Данные комплекты выпускаются в различных форматах и комплектациях, в зависимости от выявляемых типов вируса, способа детекции результата, числа реакционных доз (постановочных реакций), степени их готовности к постановке амплификации (см табл. 1).

Таблица 1

Маркировка	Состав	Комплектация
«по конечной точке» ФЛУОРОПОЛ 16	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 16 6. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (680 мкл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (100 мкл) 1 пробирка (200 мкл)
«по конечной точке» ФЛУОРОПОЛ 18	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 18 6. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (680 мкл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (100 мкл) 1 пробирка (200 мкл)
«по конечной точке» ФЛУОРОПОЛ 16+18 (без дифференциации типа)	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 16 6. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 18 7. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (680 мкл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (100 мкл) 1 пробирка (100 мкл) 1 пробирка (200 мкл)
«по конечной точке» ФЛУОРОПОЛ 16/18 (с дифференциацией типа)	1. Реакционная смесь** 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 16 6. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 18 7. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (680 мкл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (100 мкл) 1 пробирка (100 мкл) 1 пробирка (200 мкл)
«в реальном времени» ФЛУОРОПОЛ 16	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 16 7. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (200 мкл) 1 пробирка (200 мкл)

Маркировка	Состав	Комплектация
«в реальном времени» ФЛУОРОПОЛ 18	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 18 7. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (200 мкл) 1 пробирка (200 мкл)
«в реальном времени» ФЛУОРОПОЛ 16+18 (без дифференциации типа)	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 16 6. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 18 7. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (200 мкл) 1 пробирка (200 мкл) 1 пробирка (200 мкл)
«в реальном времени» ФЛУОРОПОЛ 16/18 (с дифференциацией типа)	1. Реакционная смесь** 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 16 6. Положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 18 7. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	1 пробирка (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (200 мкл) 1 пробирка (200 мкл) 1 пробирка (200 мкл)

Комплекты для проведения амплификации включают готовые к применению реагенты.

*В состав реакционной смеси входят:

- раствор ДНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (2 зонда): зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор FAM, 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, качество забора материала и выделения ДНК.

**В состав реакционной смеси входят:

- раствор ДНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (3 зонда): зонд для специфического фрагмента ВПЧ 16 содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента ВПЧ 18 содержит флуорофор 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, качество забора материала и выделения ДНК.

Комплект для проведения амплификации (по желанию клиента) может также представлять готовую к применению расфасованную по индивидуальным пробиркам амплификационную смесь (маркировка OneStep).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

100% специфичность.

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам последовательностей E2(HPV16) и E1(HPV18) ДНК вирусов папилломы

человека, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации). Использование набора ФЛУОРОПОЛ 16/18 позволяет выявлять только ДНК вируса папилломы человека типов 16 и 18 и исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

3.2. Чувствительность анализа

С помощью набора ФЛУОРОПОЛ 16/18 можно обнаружить $1,6 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл и более ДНК-матриц вируса папилломы человека каждого из типов 16 или 18 в пробе, прошедшей обработку (выделение ДНК).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

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. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из биопробы

- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб ДНК-ЭКСПРЕСС;
- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- стерильные центрифужные пробирки вместимостью 15 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»;
- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2

мл) для амплификации.

3-й этап - детекция продуктов амплификации.

- флуоресцентный детектор для детекции «по конечной точке» реакции.

6. ПРОБОПОДГОТОВКА

6.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Исследуемые образцы (соскобы эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала) поместить непосредственно в пробирки с реагентом ДНК-ЭКСПРЕСС: исследуемый материал, полученный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, содержащую 300 мкл реагента ДНК-ЭКСПРЕСС, перемешать, зонд извлечь и утилизировать, пробирку плотно закрыть.

Полученные образцы использовать в течение 2 часов для выделения ДНК. Допускается хранение проб в реагенте ДНК-ЭКСПРЕСС при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 суток или при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ не более 2 недель.

6.2. Предварительная обработка клинического материала

Исследуемые образцы в пробирке с реагентом ДНК-ЭКСПРЕСС не требуют предварительной обработки.

6.3. Выделение ДНК.

6.3.1. Пробирку с реагентом ДНК-ЭКСПРЕСС, содержащую анализируемый материал, тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 10 секунд.

6.3.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат предварительно прогретый до температуры $+98^{\circ}\text{C}$, и прогреть при температуре $+98^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут.

Примечание: перед помещением пробирок в термостат необходимо проверить, чтобы во всех пробирках был защелкнут замочек на крышках. Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру процесса не менее $+98^{\circ}\text{C}$.

6.3.3. После прогрева пробирки перенести в центрифугу и центрифугировать при 12000-16000 g (8000 - 12000 об/мин) при комнатной температуре в течение 15 секунд.

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

Полученные пробы можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более одной недели или при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ не более 6 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение ПЦР-амплификации.

7.1.1. Приготовить и, по возможности, пронумеровать **бесцветные** пробирки, соответствующие типу прибора (согласно инструкции к прибору).

7.1.2. За 20-30 минут 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.

7.1.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 (табл. 4), и тщательно перемешать пипетированием, если объем меньше 200 мкл, или на микроцентрифуге- вортексе.

Таблица 4

Разбавитель, мкл	Реакционная смесь, мкл	Объем рабочей смеси, мкл
15	5	20
30	10	40
60	20	80
300	100	400
600	200	800
900	300	1200
1200	400	1600

7.1.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести требуемый согласно инструкции к прибору объем рабочей смеси (табл. 6).

7.1.5. Для приготовления амплификационной смеси в оставшуюся рабочую смесь добавить Таq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющейся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием или на микроцентрифуге- вортексе (табл. 5).

Таблица 5

Объем рабочей смеси, мкл	Таq-полимераза
20	0,2
40	0,4
80	0,8
400	4
800	8
1200	12
1600	16

7.1.6. Внести в приготовленные пробирки, кроме фоновых, указанных в инструкции к прибору объем амплификационной смеси (табл. 6).

Таблица 6

Объем смеси на образец, мкл	Объем образцов, мкл				Примеры приборов
	Исследуемый	Отрицательный контрольный образец	Положительный контрольный образец ДНК	ДНК-экспресс (фоновый образец)	
20	5	5	5	5	Терцик/Джин-4 (ДНК-технология)
40	10	10	10	-	iCycler IQ5 (BioRad)

7.1.7. При необходимости (согласно инструкции к прибору) добавить во все пробирки указанное количество минерального масла.

7.1.8. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами в объеме 1/4 от внесенной амплификационной смеси:

- в фоновые пробирки – реагент ДНК-ЭКСПРЕСС (входит в состав набора);
- в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК ВПЧ 16 и/или ВПЧ 18.

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

7.1.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C) на микро-центрифуге-вортексе.

7.1.10. В случае проведения ПЦР с детекцией результата «по конечной точке» реакции перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+94 °C	1 минута 30 секунд	} 40 циклов
+94 °C	10 секунд	
+64 °C	10 секунд	
+72 °C	40 секунд	
+72 °C	2 минуты	
+10 °C	Хранение	

***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 16/18.*

7.1.11. При проведении ПЦР с детекцией результата «в реальном времени» амплификацию следует проводить по следующей программе:

+94 °C	1 минута 30 секунд	} 40 циклов
+94 °C	10 секунд	
+64 °C	10 секунд	
+72 °C	40 секунд	
+50 °C	считывание	

***Примечание 1.** Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Детекция продуктов амплификации

8.1.1. Детекция продуктов амплификации «по конечной точке».

При проведении ПЦР с детекцией результатов «по конечной точке» реакции следует, по окончании реакции, перенести пробирки из амплификатора в прибор для флуоресцентной детекции результатов реакции (ПЦР-детектор) и провести измерения согласно инструкции к прибору. Анализ проводится управляющей программой ПЦР-детектора автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений.

Для ПЦР-детектора «ДЖИН-4» установлены следующие пороговые значения:

Таблица 7

Возбудитель	Канал FAM		Канал ROX		Канал HEX
	-	+	-	+	ВК
ВПЧ 16	2,45	2,80			2,25
ВПЧ 18	2,45	2,80			2,25
ВПЧ 16+18 без дифференциации типа	2,45	2,80			2,25
ВПЧ 16+18 с дифференциацией типа					2,25
ВПЧ 16	2,45	2,80			
ВПЧ 18			2,45	2,80	

Примечание. Приведенные характеристики и пороговые значения отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик» и ПЦР-детекторе «ДЖИН-4». По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ 16/18.

8.1.2. Детекция продуктов амплификации «в реальном времени».

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ и интерпретация результатов.

9.1.1. При проведении детекции «по конечной точке» реакции анализ проводится управляющей программой автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений. Результат выводится в соответствующем месте протокола, зависящем от конкретной программы.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8

	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.
Анализируемые образцы	+	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 – с пороговым значением внутреннего контроля ВК.

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 могут быть представлены на диаграмме.

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, и при их отсутствии еще 2 раза повторить детекцию. Корректным считать результат, зарегистрированный не менее чем в 2 измерениях из 3.

9.1.2. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в реальном времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции следует экспортировать данные, полученные управляющей программой, и далее анализировать их в программе, предназначенной для анализа результатов.

Пороговая линия для отсечки шума и анализа выбирается согласно таблице 9.

Таблица 9

	Флуорофор	Пороговая линия	Конечный цикл
Внутренний контроль	HEX	80	35
ВПЧ 16	FAM	60	35
ВПЧ 18	FAM	60	35
ВПЧ 16 +18 без дифференциации типа	FAM	60	35
ВПЧ 16 +18 с дифференциацией типа			
ВПЧ 16	FAM	60	35
ВПЧ 18	ROX	60	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

9.1.3. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10.

	Ct FAM	Ct HEX	Результат
K+	< КЦ	любой	Специфическая реакция прошла
	N/A или > КЦ	любой	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	< КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
K-	N/A или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	N/A или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
Анализируемый образец	< КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	N/A или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	N/A или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – (обозначение программного обеспечения прибора) пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

КЦ – конечный цикл – пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией после него полностью аналогично ситуации, когда пересечение не зарегистрировано вовсе.

Примечание. Приведенные характеристики КЦ и пороговые значения представлены на примере прибора ICycler IQ5 (BioRad). По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ 16/18.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. 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.

10.2. Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 1 суток.

10.3. Срок годности набора – 6 месяцев.

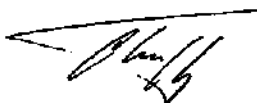
10.4. Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре +2-8°C не более одной недели или при температуре 18-20°C не более 6 месяцев.

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

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495) 589-14-03, или e-mail: info@lytech.ru и в Лабораторный Центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (499)120-60-95; 120-60-96.

Исполнительный директор

ООО НПФ «Литех»



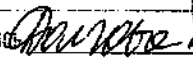
Байцур С.Г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДНО РМАПО Росздравнадзора



Долгов В.В.

Подпись 
удостоверяю: специалист
кадровой работы ГОУ ДНО
РМАПО Росздрава
подпись 