

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для обнаружения ДНК
микроорганизмов *Ureaplasma* spp. с дифференциацией вида
методом полимеразной цепной реакции

(УРЕАПОЛ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов УРЕАПОЛ предназначен для качественного обнаружения ДНК микроорганизмов *Ureaplasma* spp. с дифференциацией вида уреоплазмы (*U. urealyticum* – *U. parvum*) в биологическом материале (соскобы эпителиальных клеток из уретры, цервикального канала, влагалища, задней стенки глотки; сперма, отделяемое простаты, осадок мочи) методом полимеразной цепной реакции.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2. Набор реагентов УРЕАПОЛ может быть использован в клинической диагностике носительства уреоплазмы, а также для оценки эффективности терапии уреоплазмоза.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 100 клинических образцов, 10 проб положительного контрольного образца ДНК микроорганизмов *Ureaplasma* spp. (*U. urealyticum* и/или *U. parvum*), 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 УРЕАПОЛ основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma* (*U. urealyticum* – *U. parvum*) 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 микроорганизмов рода *Ureaplasma* (*U. urealyticum* – *U. parvum*).

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 вида уреоплазмы, используемого варианта флуоресцентной детекции результата («по конечной точке» и «в реальном времени»), степени готовности реагентов к постановке амплификации (см табл. 1).

Таблица 1

Комплектация Маркировка	Состав	Формат	
		«по конечной точке» КТ	«в реальном времени» РВ
УРЕАПОЛ <i>Ureaplasma urealyticum</i>	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка (680 мкл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (100 мкл)	1 пробирка (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (200 мкл)
УРЕАПОЛ <i>Ureaplasma parvum</i>	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка (680 мкл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (100 мкл)	1 пробирка (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (200 мкл)
УРЕАПОЛ <i>Ureaplasma spp.</i>	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка (680 мкл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (100 мкл)	1 пробирка (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (200 мкл)
УРЕАПОЛ «Флуороплекс» (с дифференциацией вида)	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК <i>U. urealyticum</i> 6. Положительный контрольный образец ДНК <i>U. parvum</i>	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 (1360 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 2 пробирки (по 2 мл) 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 –
для обнаружения микроорганизмов *U.urealyticum* / *U. parvum* или *Ureaplasma* spp. без дифференциации вида:
зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор FAM,
зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;
 - 3 зонда –
для обнаружения микроорганизмов *Ureaplasma* spp. с дифференциацией вида (Флуороплекс):
зонд для специфического фрагмента *U.urealyticum* содержит флуорофор FAM,
зонд для специфического фрагмента *U. parvum* содержит флуорофор ROX (Cy 5)
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 реакциях веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, качество забора материала и выделения ДНК.

Комплект для проведения амплификации (по желанию клиента) может также представлять готовую для применения расфасованную по индивидуальным пробиркам амплификационную смесь.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

100% специфичность.

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к консервативным участкам последовательности гена 16S РНК *U.urealyticum* и *U. parvum*, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации). Использование набора УРЕАПОЛ позволяет выявлять только ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma* и исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

3.2. Чувствительность анализа

С помощью набора УРЕАПОЛ можно обнаружить 10^4 геном-эквивалентов/мл и более ДНК-матриц *U.urealyticum* и *U. parvum* (каждого из видов) в пробе, прошедшей обработку (выделение ДНК).

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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. Удаление неиспользованных реактивов проводить в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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 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.

Образцы **соскобов** помещают 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°C не более 1 суток или при температуре -18...-20°C не более 2 недель.

Образцы **спермы и секрета простаты** собирают в одноразовую сухую стерильную пробирку. Полученные образцы использовать в течение 2 часов для выделения ДНК. Допускается хранение проб при температуре +2-8°C не более 1 суток или при температуре -18...-20°C не более 2 недель.

Моча: собрать первую порцию утренней мочи в количестве 20 мл в сухой стерильный флакон с плотно завинчивающейся крышкой; моча для исследования должна быть свежей (не охлаждать и не замораживать!).

6.2. Предварительная обработка клинического материала

Образцы **соскобов** в пробирке с «ДНК-ЭКСПРЕСС» не требуют предварительной обработки.

Образцы **спермы и секрета простаты:** 20-30 (максимум 50) мкл жидкого образца внести в пробирку с 300 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС».

Получение **осадка мочи:**

- весь объем мочи тщательно перемешать и 10-15 мл отобрать в стерильную центрифужную пробирку. Центрифугировать в течение 15-20 минут при 1500-3000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить осадок;

- суспензию осадка (0,5-1 мл) перенести со дна в одноразовую пробирку вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, пробирку плотно закрыть и центрифугировать при 8000-12000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 секунд;

- тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость;

при необходимости можно однократно промыть осадок: добавить к осадку 200-300 мкл биологического раствора, ресуспендировать на вортексе, центрифугировать при 8000 – 12000 об/мин комнатной температуре в течение 15 секунд и удалить надосадочную жидкость;

к осадку в пробирке добавить все содержимое (300 мкл) из одной пробирки с «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с приливающейся крышкой.

Хранение предварительно обработанных проб в реагенте «ДНК-ЭКСПРЕСС»: при температуре 0°C не более 1 суток или при температуре -18...-20°C не более 2 недель.

6.3. Выделение ДНК.

6.3.1. Пробирку с реагентом ДНК-ЭКСПРЕСС, содержащую анализируемый материал, тщательно смешать на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре (+18-25 °C) в течение 10 секунд.

6.3.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат предварительно прогретый до температуры + 98°C, и прогреть при температуре + 98°C в течение 20 мин.

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°C.

6.3.3. После прогрева пробирки перенести в центрифугу и центрифугировать при 12000-16000 g (1000 - 12000 об/мин) при комнатной температуре в течение 15 секунд.

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

Полученные пробы можно хранить при температуре +2-8°C не более одной недели или при температуре -18...-20°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. 2), и тщательно перемешать пипетированием, если объем меньше 200 мкл, или на микроцентрифуге- вортексе.

Таблица 2

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. 4).

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. 3).

Таблица 3

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. 4).

Таблица 4

Объем смеси на образец, мкл	Объем образцов, мкл				Примеры приборов
	Исследуемый	Отрицательный контрольный образец	Положительный контрольный образец ДНК	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 – разбавитель;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК.

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	} — 5 циклов
+94 °C	10 секунд	
+64 °C	40 секунд	
+94 °C	5 секунд	} — 35 циклов
+64 °C	30 секунд	
+10 °C	Хранение	

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

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

	1 минута 30 секунд		
+94 °C			
+94 °C	10 секунд	40 циклов	
+64 °C	11 секунд		
	считывание		
+72 °C	20 секунд		

Примечание. 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 5

Возбудитель	Канал FAM		Канал ROX(Cy 5)		Канал HEX
	-	+	-	+	ВК
Ureaplasma urealyticum	3,8	4,2			2,25
Ureaplasma.parvum	4,5	5,1			2,25
Ureaplasma spp.	3,2	3,7			2,25
U.urealyticum + U.parvum с дифференциацией	3,7	4,3	2,0	2,3	2,25

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 УРЕАПОЛ.

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 6.

Таблица 6

	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.
Анализируемы й 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 – 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 7.

Таблица 7

Образец ДНК	Флуорофор	Пороговая линия	Конечный цикл
Внутренний контроль	HEX	250	35
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	FAM	100	35
<i>Ureaplasma parvum</i>	FAM	100	35
<i>Ureaplasma spp.</i>	FAM	100	35
<i>U.urealyticum</i> + <i>U.parvum</i> с дифференциацией			
<i>U.urealyticum</i>	FAM	1	35
<i>U.parvum</i>	ROX	50	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 8.

Таблица 8.

	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 УРЕАПОЛ.

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) 258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Разработчик



Атрошкина М.Е.

«СОГЛАСОВАНО»

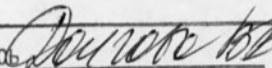
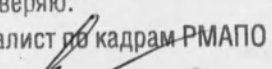
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России



Долгов В.В.

Подпись	
удостоверяю:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись	
"	20 ____ года