«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
(РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип
(комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип»** предназначен для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска (ВКР) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 1»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 3»** и **«РеалБест экстракция 100»**.

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичных для данных участков ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска гибридизационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5’-конце флуоресцентный краситель, а на 3’-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5’–3’-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5’-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце ПКО, который подвергается процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для анализа содержания ДНК ВПЧ ВКР в одном образце используется половина стрипа – четыре пробирки, содержащие ГРС 1, 2, 3, 4, в каждой из которых осуществляется амплификация ДНК трёх из 12 типов ВПЧ *(см. таблицу 1)*.

Таблица 1

Пробирка	Типы ВПЧ
ГРС1	16, 18, 39
ГРС2	33, 45, 56
ГРС3	31, 35, 58
ГРС4	52, 51, 59

Учёт эффективности выделения ДНК ВПЧ ВКР из образцов обеспечивается выделением ДНК из клинических проб совместно с предварительно внесённым **внутренним контрольным образцом (ВКО)** – ГРС 1, 2, 3.

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена β-актина человека с целью валидации качества забора материала и повышения достоверности результатов определения ДНК ВПЧ ВКР – ГРС-4.

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК ряда вирусов папилломы человека, в том числе ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска – 2 пробирки по 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР *(ГРС ВПЧ ВКР генотип)*, лиофилизированная – 4 планшета по 96 пробирок.

Набор дополнительно комплектуется:

- стрипированными крышками для пробирок (*48 стрипов по 8 штук)* или оптической плёнкой – 5 листов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Чувствительность** выявления 100 копий ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. **Специфичность выявления** ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска *(по образцам, не содержащим ДНК данного типа ВПЧ, но содержащим ДНК восьми других типов ВПЧ)* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 *(ГОСТ Р 51609-2000)*.

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности *(опасности)* и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно 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. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для пипеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой *(например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);*
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- пипетки полуавтоматические *(дозаторы механические)* одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками *(фирма «Ленпипет», Россия; фирма «Biohit», Финляндия)*;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия)*;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером *(фирма «FinnTip», Финляндия)*;
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;
- контейнер для сброса отходов *(например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный)*;
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 1»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 3»**, **«РеалБест экстракция 100»** согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и **отрицательный контрольный образец (ОКО)**, который является компонентом набора для выделения ДНК.

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 минут.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °С не более 2 суток.

ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать нужное количество пробирок для ПЦР *(одного планшета ГРС достаточно для анализа 22 исследуемых образцов)* в упаковке *(не вскрывая!)* при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

Для анализа каждого образца *(включая контрольные образцы)* требуется 4 пробирки с ГРС *(половина стрипа, содержащая ГРС-1, ГРС-2, ГРС-3, ГРС-4)*. Пробирка с ГРС-1 отмечена линией.

Внимание! *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °С составляет 3 месяца.

7.2. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы)* пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе *(см. схему)*.

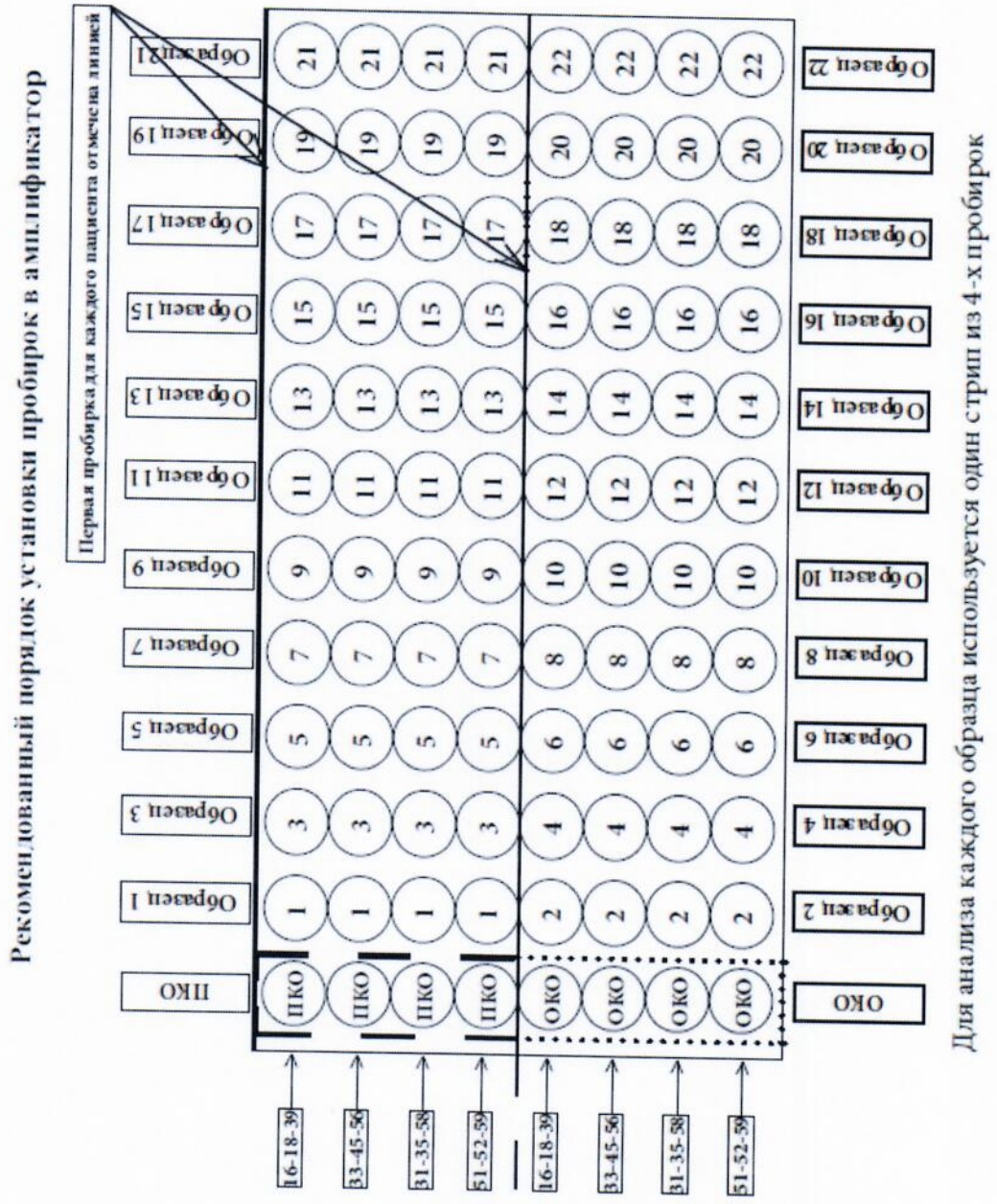
Внимание! *Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Крышки или оптическая плёнка должны оставаться чистыми!*

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по **50 мкл** соответствующего **раствора выделенной ДНК**. Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов **ДНК ВПЧ ВКР**, **ДНК ВКО** и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

Для анализа каждого образца используется один стрип из 4-х пробирок.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;
2 стадия: 95 °С – 2 минуты;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 25 секунд).*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК.

ГРС 1–3:

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК ВКО** в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором Cy5. Для детекции следует выбирать канал детекции **«Cy5».**

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК ВПЧ ВКР** в системе применён гибридизационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM, HEX, ROX. Для детекции следует выбирать каналы детекции **«FAM»**, **«HEX»**, **«ROX».**

ГРС-4:

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК гена β-актина человек**а в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором Cy5. Для детекции следует выбирать канал детекции **«Cy5»**.

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК ВПЧ ВКР** в системе применён гибридизационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM, HEX, ROX. Для детекции следует выбирать каналы детекции **«FAM»**, **«HEX»**, **«ROX»**.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, ПКО и ОКО согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой **«РеалБест диагностика»** программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учёт результатов проводить в соответствии с **разделом 9** данной инструкции и **Приложением.**

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В **ПКО** в каждой из **ГРС 1–3** программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** *(канал «Cy5»)* и определять значение порогового цикла **Ct ВКО**;

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВПЧ** *(каналы «FAM», «HEX», «ROX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО** для каждого сигнала.

Для **ПКО** в **ГРС-4** программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации **ДНК гена β-актина человека** *(канал «Cy5»)* и определять значение порогового цикла **Ct β-актина**;

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВПЧ** *(каналы «FAM», «HEX», «ROX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО** для каждого сигнала.

9.2. Для **ОКО** в каждой из **ГРС 1–3** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** *(канал «Cy5»)* и определять **Ct ВКО**, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам **«FAM»**, **«HEX»** и **«ROX»** для **ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типа** до **Ct 35** и для **ВПЧ 16** и 1**8 типа** до **Ct 40**.

Для **ОКО** в **ГРС-4** программа не должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК гена β-актина человека** *(канал «Cy5»)* до **Ct 32**.

Так же программа не должна фиксировать нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам **«FAM»**, **«HEX»** и **«ROX» до Ct 35**.

9.3. **Анализ результатов валидации образца.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3.1. **В каждом исследуемом образце** в **ГРС-4** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК гена β-актина человека** *(канал «Cy5»)*.

9.3.2. Анализируемый образец считается **валидным**, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«Cy5»** в **ГРС-4 меньше или равно 32**.

9.3.3. Для образцов, признанных невалидными *(**Ct** по каналу «Cy5» в ГРС-4 больше 32)* необходимо провести повторный забор материала для исследования.

Внимание! *Анализ исследуемого образца считается действительным только в том случае, если при анализе на валидацию образец признан валидным.*

Валидация образца позволяет оценить правильность забора материала и его хранения. В случае, если эпителиальный соскоб забран неправильно *(недостаточное количество эпителиальных клеток)* или хранился в условиях, не обеспечивающих сохранность ДНК, сигнал амплификации β-актинового гена будет заниженным, и образец будет признан невалидным.

Отрицательный результат выявления ДНК ВПЧ ВКР в таком случае может быть ложным.

9.4. Анализ результатов выявления ВПЧ ВКР.

9.4.1. В **каждом исследуемом образце в ГРС 1–3** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** *(канал «Cy5»)* и определять **Ct ВКО**.

9.4.2. Вычислить (**Ct** ВКО)$_{ср}$ как среднее значение **Ct** ВКО всех анализируемых образцов *(включая ПКО и ОКО)* отдельно для каждой из ГРС 1–3. Отбраковке подлежат значения **Ct** ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения (**Ct** ВКО)$_{ср}$. После отбраковки пересчитать (**Ct** ВКО)$_{ср}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец считается **положительным**, содержащим ДНК ВПЧ ВКР, если для этого образца значение **Ct в** каком-либо из каналов **«FAM»**, **«HEX»** или **«ROX»** *(в любой из пробирок с ГРС 1–4)* для **ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типа меньше или равно 35** или для **ВПЧ 16 и 18 типа меньше или равно 40**. Соответствие результатов анализа типам ВПЧ приведено в Таблице 2.

Анализируемые образцы могут содержать ДНК ВПЧ одного или нескольких типов в любых сочетаниях.

Таблица 2

	Положительный результат детекции в канале		
Пробирка	**«FAM»**	**«HEX»**	**«ROX»**
ГРС-1	16 тип	39 тип	18 тип
ГРС-2	33 тип	56 тип	45 тип
ГРС-3	31 тип	58 тип	35 тип
ГРС-4	52 тип	59 тип	51 тип

9.6. Анализируемый образец считается **отрицательным**, не содержащим ДНК ВПЧ ВКР *(не содержащим ДНК ВПЧ соответствующего типа)*, если для этого образца значение **Ct** по каналам **«FAM»**, **«HEX»** и **«ROX»** для **ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типа больше 35** и для **ВПЧ 16 и 18 типа больше 40 или не определяется.**

Если для такого образца значение **Ct** ВКО превышает значение *(**Ct** ВКО)$_{ср}$ более чем на 2,* то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.7. Если для ОКО значение **Ct** по каналам **«FAM»**, **«HEX»** или **«ROX»** *(в любой из пробирок с ГРС 1–4)* для **ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типа меньше или равно 35** или для **ВПЧ 16 и**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

18 типа меньше или равно 40 или значение **Ct** по каналу **«Cy5»** в **ГРС-4 меньше или равно 32,** то это свидетельствует о **наличии контаминаци**и. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ***АО «Вектор-Бест»*** *по адресу:*
630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел.: (383) 336-73-46, 332-37-58,
тел./факс: (383), 336-60-30, 332-67-52,
E-mail: plkobtk@vector-best.ru.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;
- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики *(потребительские свойства)* которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ

Проведение анализа на приборе «ДТ-96»

(НПО «ДНК-Технология»)

1. Настройка экспозиции измерений.

В режиме **«Работа с прибором»** в меню **«Настройки»** выберите пункт **«Экспозиция измерений»**.

В открывшемся окне выберите канал **«FAM»**, измените значение экспозиции на «**250**», для каналов **«HEX»** и **«ROX»** установите значение экспозиции «**1000**». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «**ДА**».

Внимание! *Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «**РеалБест**» и при необходимости должны быть изменены на исходные.*

2. Программирование амплификатора.

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку **«Создать»** во вкладке **«Запуск программы амплификации»**.

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов **«РеалБест ДНК»:**

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;
2 стадия: 95 °С – 2 минуты;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);*
Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

Для наборов **«РеалБест РНК»:**

1 стадия: 45 °С – 30 минут;
2 стадия: 94 °С – 1 минута;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);*
Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

2.3. В ячейке **«Имя программы»** ввести название созданного протокола амплификации *(например, PCR и RT-PCR)* и нажать **«ОК»**. В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать **«сохранить»**.

2.4. В ячейке **«Объём рабочей смеси»** указать значение «**50**».

2.5. Во вкладке **«Протокол»** сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню **«Тест»** выбрать **«Создать/редактировать тест»**, затем **«Копировать текущий тест»** с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте **«1.Анализ»** выставить тип анализа *(количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором)* и метод **«Геометрический (Ср)»**.

Для качественного анализа в пункте **«4.Контроли»** выставить «**1**»; для количественного анализа со стандартами *(при постановке с КО1, КО2)* в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** выставить «**2**», в ячейке **«2.Дубли»** – «**3**», в пункте **«4.Контроли»** в ячейке **«$К^+$»** выставить «**3**», в ячейке **«$К^-$»** – «**1**».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** поставить «**0**».

В пункте **«5.Объём рабочей смеси в пробирке»** выставить значение «**50**».

В пункте **«6. Флуорофоры»** обозначить **внутренний контроль (ВК)** по каналу **«FAM»** и специфику по каналу **«HEX»** или **«ROX»** в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать **«ОК»**.

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку **«Добавить тест»**, из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать **«Применить»**.

2.6. Программа перейдет на вкладку **«Запуск программы амплификации»**, запустить амплификацию кнопкой **«Запуск программы»**. Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «**Запуск программы**» в файл с расширением *.r96.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «**FAM**» и «**ROX**» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу **Геометрический (Ср)**.

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 334-35-90.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru