

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК (РНК) микроорганизмов рода *Шигелла* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Сальмонелла* (*Salmonella* spp.) и термофильных *Кампилобактерий* (*Campylobacter* spp.), аденовирусов группы F (*Adenovirus* F) и ротавирусов группы А (*Rotavirus* А), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] ОКИ скрин-FL»

Вариант FEP/FRT

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США)	13
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10	16
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 и ВЫШЕ	21
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «Джин» (С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 3.3i) и «Джин-4» (С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.4i) (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	25
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ (формат FRT)	29

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК (РНК) микроорганизмов рода *Шигелла* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Сальмонелла* (*Salmonella* spp.) и термофильных *Кампилобактерий* (*Campylobacter* spp.), аденовирусов группы F (*Adenovirus* F) и ротавирусов группы А (*Rotavirus* А), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
 - Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
 - LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай);
 - iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
 - «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия),
 - CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- а также совместно с детекторами конечной флуоресценции:
- трехканальным и четырехканальным ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия),
 - двухканальным «Джин» и четырехканальным «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹	
	вариант FEP	вариант FRT
Канал для флуорофора FAM	FAM/Специфика	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	HEX/ВК	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3

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

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

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или объемом 0,1 мл.

Программирование амплификатора

1. Включить прибор.
2. Поместить пробирки в ротор амплификатора (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе). Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой. При одновременной загрузке в ротор пробирок с несколькими типами реакционных смесей в первые две ячейки должны быть помещены пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Shigella* spp. / *Salmonella* spp.

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. Выбрать объем реакционной смеси и тип ротора:

Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл

Rotor type – 36-Well Rotor/36-луночный ротор или ***72-Well Rotor/72-луночный ротор*** в зависимости от используемого ротора.

5. Задать программу амплификации, для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.

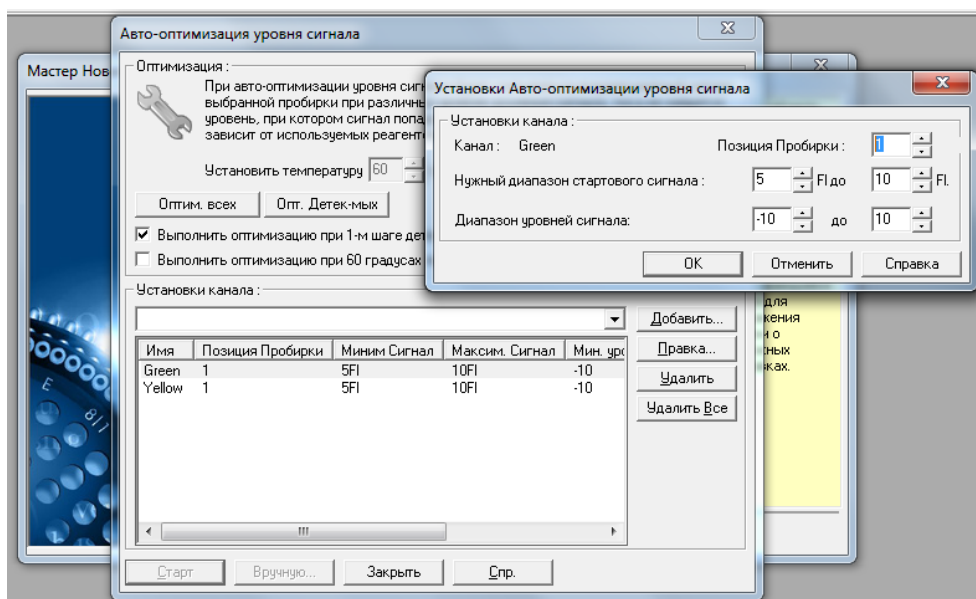
Программа амплификации для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам FAM/Green и JOE/Yellow (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

6. Задать параметры калибрования (активировать **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** в мастере нового эксперимента):

- осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (активировать **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
- осуществлять калибрование перед первым измерением (активировать **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
- установить калибровку канала FAM/Green от 5FI до 10FI, указать в **Позиция Пробирки** номер пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Shigella spp. / Salmonella spp.* (активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала**);
- установить калибровку канала JOE/Yellow – от 5FI до 10FI, указать в **Позиция Пробирки** номер пробирки с ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus / Astrovirus* (активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала**).



7. Запустить программу амплификации, активировав **Start Run/Сmapn**, и дать название эксперименту.
8. В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение исследуемых образцов, отрицательного контроля выделения, положительного и отрицательного контролей амплификации.

Для этого необходимо внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Положительный контроль ПЦР обозначить как «К+», отрицательный – как «К-». Напротив всех исследуемых образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контролей – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля выделения – тип **Negative control/Отрицательный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC/Контроль-Фон**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

Анализ результатов

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** и **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог** для каждого из основных открывшихся окон (**FAM/Green** и **JOE/Yellow**).
3. В меню каждого основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона** и установить значение **More settings/Устранение выбросов** – 5 – 10 % (для канала **FAM/Green**) и 10% (для канала **JOE/Yellow**).
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,05**.
5. Интерпретация результатов амплификации для каждого типа реакционных смесей при их одновременной загрузке в ротор проводится отдельно.
6. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для контрольных образцов В-, К+, К- в соответствии с инструкцией и пороговыми значениями *Ct*, указанными во вкладыше к набору реагентов.
7. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и пороговыми значениями *Ct*, указанными во

вкладыше к набору реагентов.

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

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

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и оптический модуль за 20-30 мин до проведения реакции.
2. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
3. Задать программу амплификации (**Protocol**).

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE/HEX (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

Дать название новому протоколу и сохранить его.

4. Задать расположение проб на платформе (**Plate**), выбрать каналы для флуорофоров FAM и JOE/HEX (**Select/add fluorophores**), активировать флуорофоры для проб в созданном протоколе с помощью клавиши **Fluorophore loading in Whole Plate mode**, выбрать **Sample Volume – 25 мкл**, **Seal Type – Domed Cap**, **Vessel Type – Tubes**, затем сохранить созданный протокол **Save/Exit Plate Editing**.
5. После этого установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
6. Запустить прибор (**Run**), выбрать **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

Анализ результатов

1. Анализ результатов проводится по каналам для флуорофоров FAM и JOE/HEX.

2. Активировать нажатием в меню кнопки **Data Analysis**.
3. Выбрать **Base line** в **Crossing Threshold User Defined** в диапазоне **20 – 25**. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать кривые другой формы. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
4. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены правильные результаты для контролей В–, К+, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
5. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

1. Включить прибор и запустить программу **RealTime_PCR**. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – **ОК1** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – образец;
 - **Контроли**: нет;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл;
 - **Флуорофоры**: Fam – специфика; Hex (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать R6G) – ВК.
 - Задать программу амплификации и нажать **ОК**.

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров Fam и Hex (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **ОК1**, указать количество образцов и нажать **ОК**.
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.

6. Выбрать закладку **Запуск программы амплификации**, проверить параметры теста. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

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

7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Мультиплекс**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и задать параметры:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %;**
 - Величина **Threshold – 10 StD** на участке линейного фитирования;
 - Критерии достоверности результатов: **нижняя граница/порог положительного результата – 10 % F (Cp), верхняя граница/порог нормализации данных – 30% F (Cp)**.
 - **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует). Нажать кнопку **Применить**.
 - Включить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Ф** (нажать кнопку).
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
6. Значения **Ct** для исследуемых образцов подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для контрольных образцов В–, К+, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
7. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора **CFX96 (Bio-Rad, США)** рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и запустить программу «**Bio-Rad CFX Manager**».
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor - New** задать параметры амплификации (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и HEX (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec.**

4. Сохранить протокол, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New** задать имя файла. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой во вкладке **Protocol**, нажав на кнопку **Select Existing....**

Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.

5. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor -**

New задать расположение пробирок в модуле. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**. Нажав на кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками флуорофоры FAM и HEX, нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.

Примечание – при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

6. Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, и задать имя файла. Выбрав или отредактировав нужную схему планшета, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.
7. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Из вкладки **Start Run** запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**. Сохранить эксперимент.
8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов).

1. Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.
2. Поочередно для каждого канала установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции K+ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.
3. При нажатии кнопки панели инструментов **View/Edit Plate...** откроется окно, в котором можно дать название или переименовать образцы.
4. Значения C_t для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов B-, K+, K- в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

5. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения C_t , не превышающие значения порогового цикла, указанного во вкладыше, считаются положительными.
6. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10

Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором ALA-1/4 проводится согласно инструкции по эксплуатации к прибору.

Установка параметров теста Shig/Salm

1. Запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста **Shig/Salm**, нажать кнопку **OK**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (**FAM, HEX**)
6. В полях **p-** и **p+** установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической ДНК (см. вкладьш к набору реагентов).
7. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:
Shigella = **FAM**;
Salmonella = **HEX**.
8. В поле **Доверительный интервал** установить значение 555 %.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

Установка параметров теста Camp/Adeno

1. Запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста **Camp/Adeno**, нажать кнопку **OK**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (**FAM, HEX**)
6. В полях **p-** и **p+** установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической ДНК (см. вкладьш к набору реагентов).
7. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с

каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:

Campylobacter = **FAM**;

Adenovirus F = **HEX**.

8. В поле **Доверительный интервал** установить значение 555 %.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

Установка параметров теста Rota/Astro

1. Запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста **Rota/Astro**, нажать кнопку **OK**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (**FAM, HEX**).
6. В полях **p-** и **p+** установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической РНК (см. вкладыш к набору реагентов).
7. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:

Rotavirus = **FAM**;

Astrovirus = **HEX**.

8. В поле **Доверительный интервал** установить значение 555 %.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

Установка параметров теста Noro/ВКО

1. Запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста **Noro/ВКО**, нажать кнопку **OK**.

5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (**FAM**, **HEX**), в группе ВКО отметить канал, который используется для внутреннего контроля (**FAM**).
6. В полях **п-** и **п+** установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каналу для детекции специфической РНК (см. вкладыш к набору реагентов).
В поле **ВКО/фон** задать пороговое значение отношения сигнала по каналу для детекции ВКО к фону (см. вкладыш к набору реагентов).
7. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:
Norovirus = HEX.
8. В поле **Доверительный интервал** установить значение 555 %.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

Измерение флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Для этого в главном меню выбрать **Протокол** → **Создать новый** или **Открыть**, чтобы открыть созданный ранее протокол.
3. В окне протокола необходимо выбрать тип используемого ротора (**36 x 0,5** или **48 x 0,2**), ввести номер протокола, выбрать нужный тест (**Shig/Salm**, **Camp/Adeno**, **Rota/Astro**, **Noro/ВКО**) в меню-вкладке **Тест** и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
4. Обозначить образцы, которые являются фоновыми для данной группы образцов, как **ФОН** (используя сочетание клавиш **Ctrl** и **F**). В качестве образцов, обозначенных **ФОН** использовать пробирки с образцами **ФОН**.
5. Закрыть окно редактирования протокола, нажав на кнопку **Exit** в верхнем левом углу панели. Протокол сохранить.
6. Поставить пробирки в ячейки ротора в соответствии с заданной последовательностью и запустить детекцию, выбрав в меню **Протокол** → **Детекция** или значок **Детекция по протоколу** на панели инструментов (вверху экрана). По окончании измерения на экран будет выведена таблица результатов.

Интерпретация результатов

1. Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы **ALA_1**. Результаты в таблице представляются с помощью следующих обозначений:

«**обнаружено**» – положительный результат;

«**не обнаружено**» – отрицательный результат;

«**сомнительно**» – результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК/РНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»);

«**нд**» – недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).

2. Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК/РНК (см. табл. 1).

Таблица 1

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования для теста Noro/ВКО**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации	
		Канал FAM	Канал HEX
В–	Экстракция ДНК/РНК	ВКО+	«не обнаружено»
К–	ПЦР	ВКО–	«нд»
К+ <i>Norovirus 2</i> генотип/STI	ПЦР	ВКО–	«обнаружено»

3. Результаты постановки контролей для тестов Shig/Salm, Camp/Adeno, Rota/Astro представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования для тестов
Shig/Salm, Camp/Adeno, Rota/Astro**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации	
		Канал FAM	Канал HEX
В–	Экстракция ДНК/РНК	«не обнаружено» (для всех тестов)	«не обнаружено» (для всех тестов)
К–	ПЦР	«не обнаружено» (для всех тестов)	«не обнаружено» (для всех тестов)
К+ <i>Shigella/Salmonella</i>	ПЦР	«обнаружено»	«обнаружено»
К+ <i>Campylobacter/Adenovirus</i>	ПЦР	«обнаружено»	«обнаружено»
К+ <i>Rotavirus/Astrovirus</i>	ПЦР	«обнаружено»	«обнаружено»

4. Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводится в

соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

5. Образцы, для которых получен результат **нд** (кроме К–), требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК из исследуемого материала. Для образца К– результат **нд** является нормой.
6. Образцы, для которых получен результат **сомнительно**, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.
7. Если результаты контрольных образцов не соответствуют указанным значениям, требуется предпринять меры, указанные в инструкции к набору реагентов.

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 и ВЫШЕ



1. Включить прибор и запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Тест для обнаружения *Rotavirus A*, *Astrovirus*, *Norovirus 2* генотипа, *Shigella* и EIEC, *Salmonella*, *Campylobacter* может быть предустановлен в программе **ALA_1**.
3. Проверить наличие теста «ОКИ-скрин» в списке настроенных тестов можно, выбрав в основном меню программы **Настройки**→**Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** в таблице **Список тестов** найти тест «ОКИ-скрин».
4. Если тест «ОКИ-скрин» не был предустановлен в программе **ALA_1**, то для проведения детекции и интерпретации результатов необходимо создать новый тест или импортировать его через архивный файл в список тестов, используемых на программе **ALA_1**.

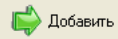
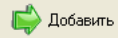
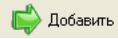
ВНИМАНИЕ! Импорт или создание новых тестов в программе **ALA_1** возможно только для пользователей с правами администратора.




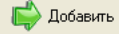

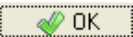

Импортировать новый тест

Импорт новых тестов в программе **ALA_1** осуществляется через выбор основного меню **Настройки**→**Импорт тестов**. Далее выбрать архивный файл в формате *.zip и импортировать его в программу.

Создать новый тест

- Выбрать в основном меню программы **Настройки** → **Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** добавить название нового теста «ОКИ-скрин» кнопкой  **Добавить** в таблице **Список тестов**.
- В поле **Реакционная смесь** задать название реакционных смесей: **Noro-STI**, **Rota-Astro**, **Shig-Salm**, **Camp-Adeno**.
- Для реакционной смеси **Noro-STI** в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: **FAM** и **HEX**. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал **FAM** и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу: **ВКО**, установить значение порога: **3,0**. Далее для канала **HEX** задать обозначения по

- этому каналу: **Noro**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. В поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.
- Для реакционной смеси **Rota-Astro** в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: **FAM** и **HEX**. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал FAM и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу: **Rota**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. Далее для канала HEX задать обозначения по этому каналу – **Astro**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. В поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.
 - Для реакционной смеси **Shig-Salm** в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: **FAM** и **HEX**. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал FAM и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу: **Shig**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. Далее для канала HEX задать обозначения по этому каналу: **Salm**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. В поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.
 - Для реакционной смеси **Camp-Adeno** в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: **FAM** и **HEX**. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал FAM и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу: **Camp**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. Далее для канала HEX задать обозначения по этому каналу: **Adeno**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. В поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.
 - Отметить контроли, использующиеся в этом тесте: **B-** (отрицательный контроль выделения), **K+** (положительный контроль амплификации), **K-** (отрицательный контроль амплификации). Выбрать алгоритмы интерпретации для контролей по умолчанию.

- В поле **Таблица интерпретации результатов** нажать кнопку  **Создать**. Программой **ALA_1** будет автоматически создана таблица возможных вариантов сочетаний результатов детекции для всех реакционных смесей для всех каналов и итоговый результат для каждого из этих вариантов. Продолжением этой таблицы являются возможные варианты сочетаний результатов контролей. Результаты детекции клинических образцов и контролей будут выдаваться после измерения в соответствии с этой таблицей. Сохранение теста и закрытие окна осуществляется кнопкой  **OK**.
- 5. Создать протокол измерения.
 - В основном окне программы нажать кнопку  **Новый протокол**. В появившемся окне **Окно настройки протокола** выбрать тест «ОКИ-скрин» из списка доступных тестов и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный тест появится в списке **Тесты протокола**.
 - В поле **Количество образцов** задать количество исследуемых образцов без контрольных образцов и образцов **ФОН**, нажать кнопку  **Добавить**. В поле **Количество фоновых пробирок** выбрать их необходимое количество для каждой реакционной смеси.
 - В **Таблице имен образцов, фоновых пробирок и контролей** задать имена образцов, добавить необходимое количество контролей. В поле **Тип ротора** выбрать ротор, который будет использоваться в данном протоколе. Сохранение протокола и закрытие окна осуществляется кнопкой  **OK**.
- 6. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора **ALA-1/4** в соответствии с заданной последовательностью. Запустить измерение, нажав на кнопку  **Измерить** в панели активных кнопок (вверху экрана).

Интерпретация результатов

1. Результат измерения выдается программой после завершения измерения протокола в окне **Окно результатов**. Полученные данные интерпретируются программой автоматически в соответствии с **Таблицей интерпретации результатов**:
 - **обнаружено (Noro)** указывается для образцов, в которых обнаружена РНК *Norovirus 2* генотипа, аналогично для *Rotavirus*, *Astrovirus*;

- **обнаружено (Shig)** указывается для образцов, в которых обнаружена ДНК *Shigella* spp. и *EIEC*, аналогично *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. и *Adenovirus*;
 - **не обнаружено** указывается для образцов, в которых не обнаружена РНК *Norovirus* 2 генотипа, *Rotavirus*, *Astrovirus*, ДНК *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* и *Adenovirus*;
 - **невалидный** указывается для образцов, у которых не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК из исследуемого материала
 - **сомнительный** указывается для образцов, у которых сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК/РНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.
2. Интерпретацию результатов проведенного тестирования исследуемых образцов проводить в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
 3. Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными если получены правильные результаты для контролей В–, К+, К– (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов).
 4. Если результаты для контролей не соответствуют указанным значениям, требуется предпринять меры, указанные в инструкции к набору реагентов.

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «Джин» (С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 3.3i) и «Джин-4» (С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.4i) (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

Детекция проводится согласно описанию в паспорте «Детектор полимеразной цепной реакции флуоресцентный «Джин»».

Для детекции и интерпретации результатов используются настройки, указанные во вкладыше к набору реагентов.

Настройка тестов

Для детекции и интерпретации результатов используются следующие настройки для тестов:

Noro/ВКО:

- Наименование теста – Noro/ВКО;
- Специфика по каналу **Hex (ПО 4.4i) / ВК (ПО 3.3i)**, внутренний контроль по каналу **Fam (ПО 4.4i) / Специфика (ПО 3.3i)**;
- Пороговые значения для канала **Fam/Специфика** должны составлять **3,0**; для канала **Hex/ВК: $p- = 2,5$ и $p+ = 3,0$.**

Rota/Astro:

- Наименование теста – Rota/Astro;
- Специфика по каналам **Hex (ПО 4.4i) / ВК (ПО 3.3i)**, **Fam (ПО 4.4i) / Специфика (ПО 3.3i)**;
- Пороговые значения для каналов **Fam/Специфика** и **Hex/ВК** должны составлять **$p- = 2,5$ и $p+ = 3,0$.**

Shig/Salm:

- Наименование теста – Shig/Salm;
- Специфика по каналам **Hex (ПО 4.4i) / ВК (ПО 3.3i)**, **Fam (ПО 4.4i) / Специфика (ПО 3.3i)**;
- Пороговые значения для каналов **Fam/Специфика** и **Hex/ВК** должны составлять **$p- = 2,5$ и $p+ = 3,0$.**

Camp/Adeno:

- Наименование теста – Camp/Adeno;
- Специфика по каналам **Hex (ПО 4.4i) / ВК (ПО 3.3i)**, **Fam (ПО 4.4i) / Специфика (ПО 3.3i)**;
- Пороговые значения для каналов **Fam/Специфика** и **Hex/ВК** должны составлять **$p- = 2,5$ и $p+ = 3,0$.**

Настройки теста можно установить, выбрав меню **Настройки, Список тестов** в главном меню программы, и если значения изменены, требуется **восстановить начальные значения, указанные выше.**

1. Включить прибор и запустить программу **Gene** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Ввести количество измеряемых образцов и количество фоновых пробирок (**2** на каждый тип теста), выбрать нужный тест (**Shig/Salm, Camp/Adeno, Rota/Astro, Noro/ВКО**) в графе **Тест**, нажать кнопку **ОК** (кнопкой мыши) и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
3. В качестве образцов, обозначенных **ФОН**, использовать пробирки с образцами **ФОН**.
4. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «Джин» в соответствии с заданной последовательностью (сначала первые 12 образцов) и запустить детекцию, нажав кнопку, обозначенную значком цветной призмы, в панели активных кнопок (вверху экрана). По окончании детекции первой группы заменить пробирки и продолжить измерения, нажав кнопку **ОК**. По окончании детекции вынуть пробирки и нажать кнопку **ОК**.

Интерпретация результатов

1. Результаты автоматической интерпретации ПЦР-детектора «Джин» (двухканального) **не используются**. Анализ полученных результатов проводить в соответствии с инструкцией, вкладышем и таблицей 3.

Таблица 3

Оценка результатов анализа

Тестируемые пробирки	Результат автоматической интерпретации	Результат по уровню флуоресценции		Результат
		Канал Fam/Специфика	Канал Hex/ВК	
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus / Astrovirus</i>	+	+	-	В пробе выявлена РНК <i>Rotavirus A</i>
	-	-	+	В пробе выявлена РНК <i>Astrovirus</i>
	«нд»	-	-	В пробе не выявлена РНК <i>Rotavirus A</i> и РНК <i>Astrovirus</i>
	+	+	+	В пробе выявлена РНК <i>Rotavirus A</i> и РНК <i>Astrovirus</i>
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus / STI</i>	+	+	-	В пробе не выявлена РНК <i>Norovirus 2</i> генотип
	-	-	+	В пробе выявлена РНК <i>Norovirus 2</i> генотип
	«нд»	-	-	Проба требует повторного перевыделения и тестирования на всех смесях

Тестируемые пробы	Результат автоматической интерпретации	Результат по уровню флуоресценции		Результат
		Канал Fam/Специфика	Канал Hex/ВК	
	+	+	+	В пробе выявлена РНК <i>Norovirus 2</i> генотип
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Shigella</i> spp. / <i>Salmonella</i> spp.	+	+	–	В пробе выявлена ДНК <i>Shigella</i> spp.
	–	–	+	В пробе выявлена ДНК <i>Salmonella</i> spp.
	«нд»	–	–	В пробе не выявлена ДНК <i>Shigella</i> spp. и ДНК <i>Salmonella</i> spp.
	+	+	+	В пробе выявлена ДНК <i>Shigella</i> spp. и ДНК <i>Salmonella</i> spp.
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Campylobacter</i> spp./ <i>Adenovirus</i>	+	+	–	В пробе выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp.
	–	–	+	В пробе выявлена ДНК <i>Adenovirus</i> F
	«нд»	–	–	В пробе не выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp. и ДНК <i>Adenovirus</i> F
	+	+	+	В пробе выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp. и ДНК <i>Adenovirus</i> F

Кроме указанных вариантов, пробы, результат в которых обозначается знаком «?», требуют повторного анализа в связи с получением сигнала, который нельзя однозначно интерпретировать как положительный по обнаружению ДНК *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Shigella* spp. / *Salmonella* spp. и ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Campylobacter* spp./ *Adenovirus*) или кДНК *Rotavirus* A (ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus*/*Astrovirus*) или пробы, требующие перевыделения и повторной постановки на всех ПЦР-смесях-1 (ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI).

2. Для «Джин-4» (четырёхканального) полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы **Gene** (колонка **Результат** на экране).

- знаком **+** (на красном фоне) обозначаются положительные образцы;
- знаком **–** (на зеленом фоне) – отрицательные образцы;
- знаком **?** (на желтом фоне) обозначается сомнительный результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК/РНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»)). Для таких образцов требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными;
- **нд** (на оранжевом фоне) обозначается недостоверный результат (в образце не

детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).

3. Интерпретация результатов проведенного тестирования исследуемых образцов проводится в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов
4. Результаты ПЦР-исследования считаются достоверным, если получены правильные результаты прохождения контрольных образцов В-, К+, К- в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. в инструкции и вкладыш к набору реагентов).
5. Образцы, для которых получен результат **нд** (кроме К-), требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК из исследуемого материала. Для образца К- результат **нд** является нормой.
6. Если результаты для контролей не соответствуют указанным значениям, требуется предпринять меры, указанные в инструкции к набору реагентов.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ (формат FRT)

Если для пробы в таблице результатов зафиксировано значение порогового цикла, но график флуоресценции по этому каналу не имеет правильной формы с участком характерного экспоненциального подъема флуоресценции (график представляет собой прямую линию), результат является ошибочным, его нельзя интерпретировать как положительный. Такой результат может свидетельствовать о неправильно установленном уровне пороговой линии (или других параметров анализа). Если результат получен при правильном уровне порога (и других параметрах), то для данного образца (образцов) необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК.

Если для отрицательного контроля в таблице результатов зафиксировано значение порогового цикла, но график флуоресценции по этому каналу не имеет правильной формы с участком характерного экспоненциального подъема флуоресценции (в частности, если график представляет собой прямую линию), результат является ошибочным, его интерпретировать как отрицательный.