

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК вирусов
папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов в
клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной
детекцией

«АмплиСенс[®] ВПЧ 16/18-FL»

Формат 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 ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США).....	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	23
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	28
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	33

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000 (четырёхканальный), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмБХ»), Германия);
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
Канал для флуорофора FAM	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR

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)

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

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.

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки в ротор амплификатора так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установить ротор в прибор, закрыть крышку (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

ВНИМАНИЕ! Если ротор прибора заполнен не полностью, то его следует уравновесить. Для этого заполнить незанятые места пустыми пробирками (*нельзя использовать пробирки от предыдущих экспериментов*). Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
5. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**), и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками (Rotor-Gene 3000) / закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
6. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл** для варианта **FRT-100 F** или **30 мкл** для варианта **FRT**. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

7. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать параметры амплификации (см. табл. ниже)

Таблица 1

Программа амплификации «ДНК ВПЧ 16-18»

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	15 с	–	45
	60	35 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling1/ Циклирование1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling2/ Циклирование2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

8. После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
9. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн..**
- измерить флуоресценцию по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - установить калибровки каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Автоматизация уровня сигнала**, указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал – 4, Max Reading/Максим. Сигнал – 8**);
 - провести калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange перед первым измерением (отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
11. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

12. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как **K-**, калибраторы – **K1, K2, K3**. В колонке **Type/Тип** напротив всех исследуемых клинических образцов и калибраторов установить тип **Unknown/Образец**, для отрицательного контроля ПЦР – тип **Negative control/Отрицательный контроль**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

ВНИМАНИЕ! При установке типа **None/Пусто** данные образца анализироваться не будут!

Обработка и анализ результатов

По каналам FAM/Green и JOE/Yellow детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX/Orange детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β-глобинового гена). Результаты тестирования интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с установленной на соответствующем уровне пороговой, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**; **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** и **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange).
3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,03**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.

7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные результаты**) выделить колонку **Name/Имя**, однократно щелкнув левой кнопкой мыши на заголовке. Скопировать колонку, выбрав **Сору/Копировать** из контекстного меню (вызывается правой кнопкой мыши).
8. Открыть прилагающийся к набору реагентов файл Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix, согласиться на включение макроса.
Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.
9. Установить курсор на ячейку **Name** столбца **Обозначение** и, щелкнув правой кнопкой мыши, выбрать **Вставить** из контекстного меню.
10. Аналогично выбрать и скопировать колонку **St** из таблицы результатов (**Quant.Results/Количественные результаты**). Установить курсор в таблице Excel в ячейку **St** под названием соответствующего флуоресцентного красителя и, щелкнув правой кнопкой мыши, выбрать **Вставить** из контекстного меню.
11. Повторить процедуру для других флуоресцентных красителей.

При проведении качественного определения

12. Установить режим **Качественный анализ**.
13. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix).
14. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

При проведении количественного определения:

15. Установить режим **Количественный анализ**, внутренняя калибровка.
16. Внести данные концентраций калибраторов в таблицу **Знач. калибр.** в соответствие с вкладышем к данной серии набора реагентов.
17. В столбце **Обозначение** проверить, что калибратор К1 имеет имя **К1**, калибратор К2 имеет имя **К2**, калибратор К3 имеет имя **К3** (без пробела между буквой К и цифрой), отрицательный контроль – **К-** или «-».
18. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в

матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), слабopоложительный (**weak**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix). Далее в таблице отображается количество 2n наборов геномов человека (отражает количество клеток) на реакцию (используется для оценки валидности образца). Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по генотипам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии с таблицей ниже.

Таблица 3

Интерпретация полученных результатов Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)

Результат Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

19. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

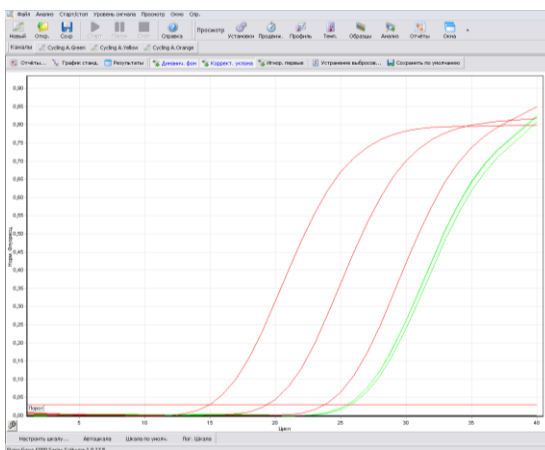
Интерпретация результатов

Значения, полученные для исследуемых образцов, подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для калибраторов, отрицательного контроля амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК:

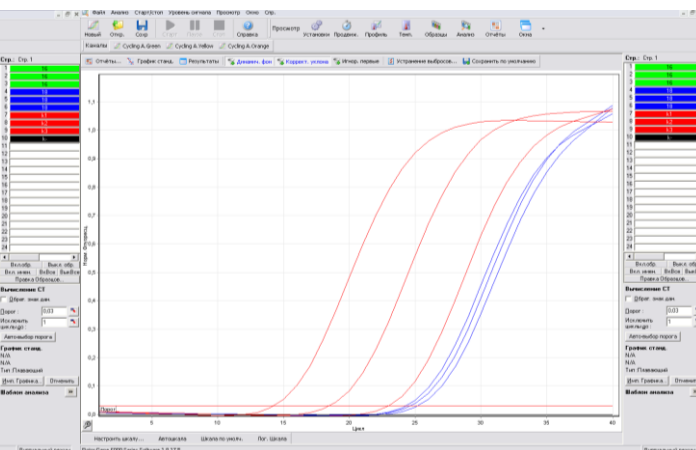
- в отрицательном контроле экстракции (В–) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
- в отрицательном контроле ПЦР (К–) – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
- в калибраторах ВПЧ (К1, К2, К3) – **К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18** – должны появиться значения *Ct* по каждому каналу.

Пример полученных результатов

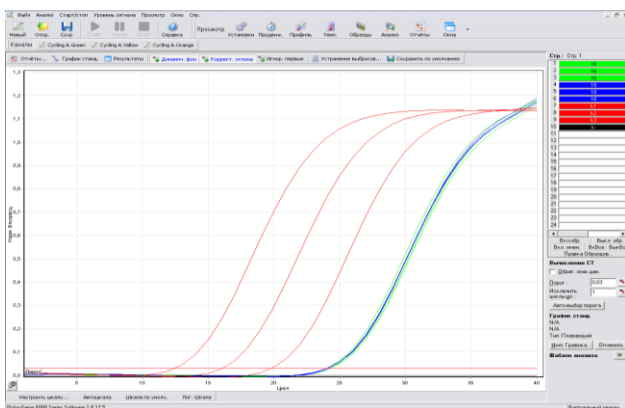
Данные по каналу FAM/Green



Данные по каналу JOE/Yellow



Данные по каналу ROX/Orange



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и 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 тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (детекция через крышку пробирки).

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее 15 мин.

2. Открыть программу iCycler iQ/iQ5.

3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Следить 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 переворачивать стрипы при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:

- для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета возможно в режиме **Whole Plate loading**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) **25** мкл для варианта **FRT-100 F** или **30** мкл для варианта **FRT**, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам **FAM**, **JOE/HEX** и **ROX**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
- для прибора **iCycler iQ** в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop** в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM-490**, **JOE-530** и **ROX-575**.

Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**. Для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

2. Все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-».
3. Задать программу амплификации.

Таблица 4

Программа амплификации «ДНК ВПЧ 16-18»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	45
	60	1 мин	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530, ROX/ROX-575	

Таблица 5

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530, ROX/ROX-575	
	72	15 с	–	

- для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать программу амплификации, а в окне справа указать

шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 2 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (файл с расширением .tmo) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

4. Перед запуском выполнения программы:

- для прибора **iCycler iQ5** необходимо проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- для прибора **iCycler iQ** в окне **Run Prep** необходимо проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume – 25 мкл** для варианта **FRT-100 F** или **30 мкл** для варианта **FRT**. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

5. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Обработка и анализ результатов

По каналам FAM/FAM-490 и JOE/HEX/JOE-530 детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX/ROX-575 детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты тестирования интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ данных

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого:
 - для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**;
 - для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
2. Просмотреть полученные данные. Для этого:
 - для прибора **iCycler iQ5** выбрать режим анализа данных **Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию);
 - для прибора **iCycler iQ** на вкладке **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок соответствующего канала. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию)
3. Просматривать данные следует отдельно по каждому каналу.
4. Установить уровень пороговой линии. Для этого:
 - для прибора **iCycler iQ5** в окне **Base Line Threshold** установить параметр **Base Line Cycles – Auto Calculated** (в случае «заваливания» кривых установить данный параметр в режим **User Defined, 2 through 10 cycles**), параметр **Crossing Threshold – Auto Calculated**. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов;
 - для прибора **iCycler iQ** в меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим автоматической установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **Auto Calculated**. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, то в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined** и повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив

уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов.

5. Щелкнуть правой кнопкой мыши на появившейся таблице с результатами. В выпадающем меню выбрать **Export to Excel**. Согласиться на сохранение файла. В случае если на компьютере установлена программа Microsoft Excel, данный файл откроется автоматически (если данная программа не установлена, дальнейшая обработка осуществляется на компьютере с Excel). Структура данного файла такова, что сначала последовательно следуют все результаты по каналу FAM/FAM-490, затем JOE/HEX/JOE-530 и ROX/ROX-575.

6. Открыть прилагающийся к набору файл Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix (*программа расчета результатов*), согласиться на включение макроса.

Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.

7. В файле с результатами выделить и скопировать ячейки столбца **Threshold Cycle (Ct)**, соответствующие каналу FAM/FAM-490. Перейти к программе расчета результатов и вставить скопированные ячейки в столбец FAM, начиная с первой ячейки.

8. Аналогично скопировать ячейки столбца **Threshold Cycle (Ct)**, соответствующие каналу JOE/HEX/JOE-530 и ROX/ROX-575 в столбцы JOE и ROX программы расчета результатов.

9. Скопировать имена образцов из столбца **Identifier** (если они обозначались) в столбец **Name** программы расчета.

При проведении качественного определения

10. Установить режим **Качественный анализ**.

11. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix).

12. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

При проведении количественного определения

13. Установить режим **Количественный анализ**, внутренняя калибровка.
14. Внести данные концентраций калибраторов в таблицу **Знач. калибр.** в соответствие с вкладышем к данной серии набора реагентов.
15. В столбце **Обозначение** проверить что калибратор К1 имеет имя **К1**, калибратор К2 имеет имя **К2**, калибратор К3 имеет имя **К3** (без пробела между буквой К и цифрой), отрицательный контроль – «**К-**» или «**-**».
16. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), слабopоложительный (**weak**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix). Далее в таблице отображается количество 2n наборов геномов человека (отражает количество клеток) на реакцию (используется для оценки валидности образца). Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по генотипам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии с таблицей ниже.

Таблица 6

Интерпретация полученных результатов Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)

Результат Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

17. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

Интерпретация результатов

Значения, полученные для исследуемых образцов, подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для калибраторов, отрицательного контроля амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК:

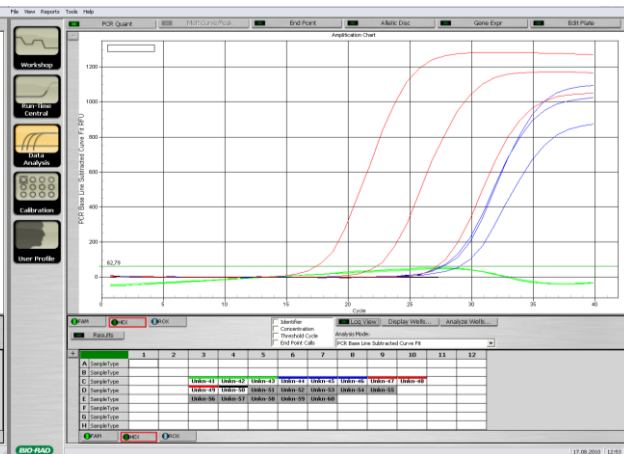
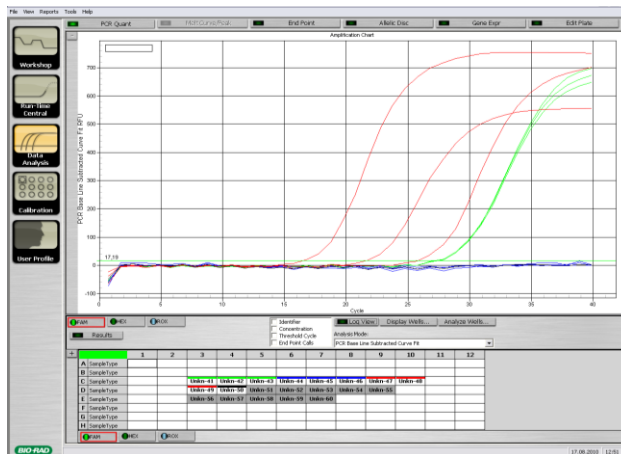
- в отрицательном контроле экстракции (В-) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
- в отрицательном контроле ПЦР (К-) – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;

- в калибраторах ВПЧ (К1, К2, К3) – К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18 - должны появиться значения C_t по каждому каналу.

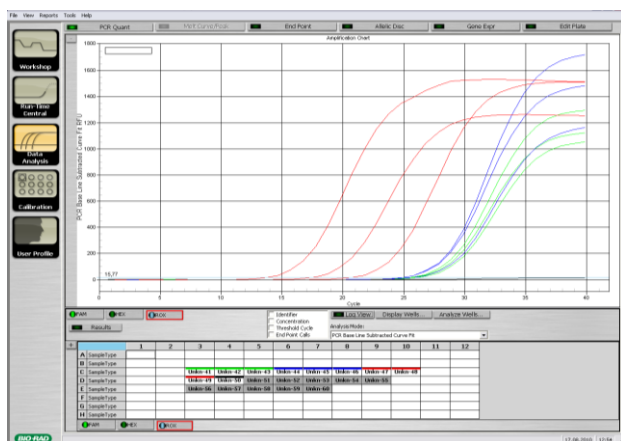
Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM/FAM-490

Данные по каналу JOE/HEX/JOE-530



Данные по каналу ROX/ROX-575



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США)

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 оптически прозрачной крышкой (детекция через крышку пробирки).

1. Включить прибор, запустить программу Mx3000P/Mx3005P.
2. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее 15 мин.

3. Установить пробирки в прибор, закрыть фиксатор и дверцу прибора.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **HEX/JOE filter set** установить параметр **JOE**, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр **FAM**, напротив пункта **ROX filter set** установить параметр **ROX**.

ВНИМАНИЕ! Следить 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 переворачивать стрипы/плашку при установке в прибор.

5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - а) выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью).
 - б) В окне **Well type** обозначить все выделенные ячейки как **Unknown**. Для опции **Collect fluorescence data** установить три флажка **FAM**, **JOE** и **ROX**. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Information**). Внести подписи образцов также можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.
6. Задать программу амплификации. Для этого можно использовать один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется)

Перейти на вкладку **Thermal Profile Setup**. Нажать кнопку **Import...** справа от изображения профиля термоциклирования. Перейти в папку, содержащую

предшествующий экспериментальный файл, и открыть его. В окне **Thermal Profile** появиться необходимый профиль термоциклирования.

Самостоятельное программирование

- На вкладке **Plate Setup** выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки. Перейти в меню **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации:

Таблица 7

Программа амплификации «ДНК ВПЧ 16-18»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	45
	60	1 мин	FAM, JOE/HEX, ROX	

Таблица 8

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. температуры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	72	15 с	–	

- Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data collection marker by dragging** и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.
- Запустить амплификацию, нажав кнопку **Run**, затем **Start** и присвоив имя файлу эксперимента.

Обработка и анализ результатов

По каналам FAM и JOE/HEX детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты тестирования интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в

середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ данных

1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок). В противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Убедиться, что три флуоресцентных канала активны (кнопки **JOE**, **FAM** и **ROX** нажаты в поле **Assays Shown** внизу окна программы).
5. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив трех флуоресцентных каналов: **JOE**, **FAM** и **ROX**. Проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае, если автоматически выбранный порог пересекает отрицательные образцы, следует поднимать значение порога до тех пор, пока пороговая линия не будет пересекать только положительные образцы. (По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, следует дважды щелкнуть левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties** для оси Y (Y axis) поставить галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**).
6. В области **Text Report** просмотреть результаты и провести экспорт данных (например, в Excel, для чего на поле таблицы результатов нажать правую кнопку мыши и в появившемся меню выбрать **Export Text Report>Export Text Report to Excel**) для дальнейшего обсчета.
7. Открыть прилагающийся к набору реагентов файл Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix» (программа автоматической интерпретации результатов), согласиться на включение макроса.

Примечание – Если при открытии документа Excel макрос не активируется (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Результаты** неактивна) необходимо

изменить уровень безопасности Microsoft Excel. Для этого надо выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.

8. Скопировать из открывшегося окна **Text Report** имена образцов из колонки **Well name** в колонку **Обозначение** программы автоматической интерпретации результатов.
9. Далее скопировать значения пороговых циклов для всех трех каналов в соответствующие ячейки программы автоматической интерпретации результатов.

При проведении качественного определения:

10. Установить режим **Качественный анализ**.
11. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix).
12. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

При проведении количественного определения:

13. Установить режим **Количественный анализ**, внутренняя калибровка.
14. Внести данные концентраций калибраторов в таблицу **Знач. калибр.** в соответствие с вкладышем к данной серии набора реагентов.
15. В столбце **Обозначение** проверить, что калибратор К1 имеет имя **К1**, калибратор К2 имеет имя **К2**, калибратор К3 имеет имя **К3** (без пробела между буквой К и цифрой).
16. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), слабopоложительный (**weak**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix). Далее в таблице отображается количество 2n наборов геномов человека (отражает количество клеток) на реакцию, (используется для оценки валидности образца). Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по генотипам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка

клинической значимости результата в соответствии с таблицей ниже:

Таблица 9

Интерпретация полученных результатов Ig (ВПЧ на 100 тыс.клеток)

Результат Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

17. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

Интерпретация результатов

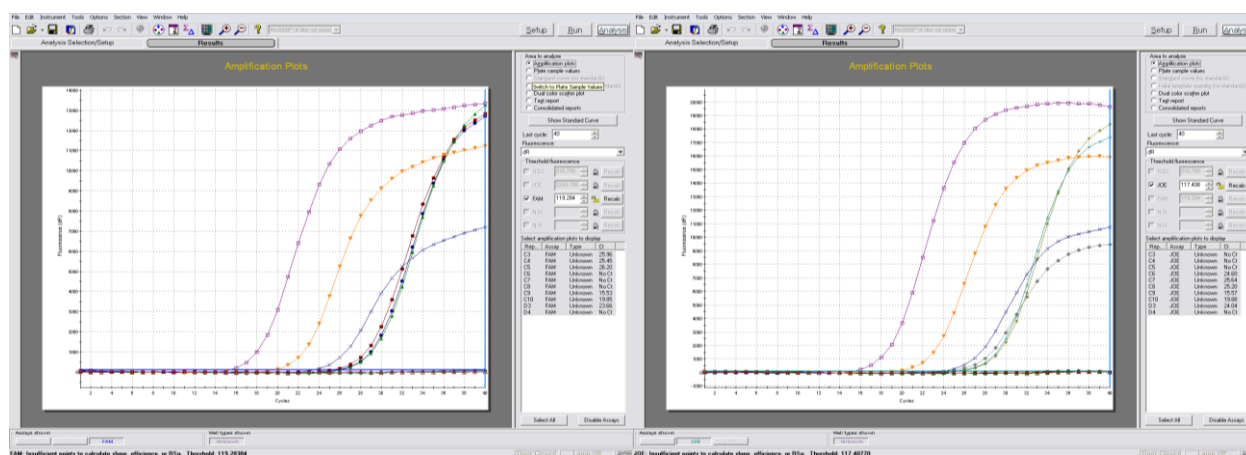
Значения, полученные для исследуемых образцов, подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для калибраторов, отрицательного контроля амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК:

- в отрицательном контроле экстракции (В–) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений C_t ;
- в отрицательном контроле ПЦР (К–) – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений C_t ;
- в калибраторах ВПЧ (К1, К2, К3) – **К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18** - должны появиться значения C_t по каждому каналу.

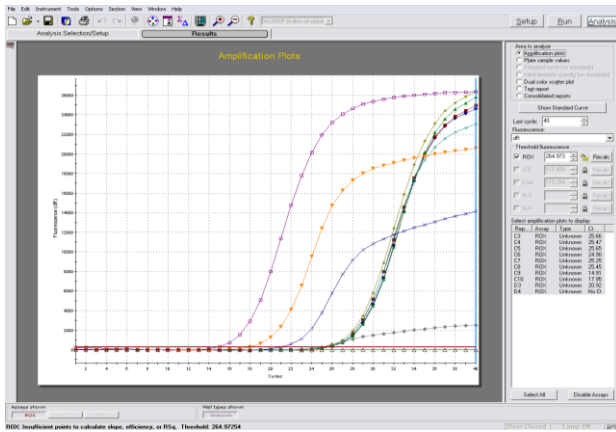
Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM

Данные по каналу JOE/HEX



Данные по каналу ROX



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 тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (детекция через крышку пробирки).

1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3. 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 – **ВПЧ 16/18** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – Качественный;
 - **Метод** – Пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль – ;
 - **Контроли**: положительный (К+) – 3 (для количественного формата) или 1 (для качественного формата), отрицательный (К-) – 1;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл для варианта FRT-100 F или 30 мкл для варианта FRT;
 - **Флуорофоры** – **Fam, Hex – специфика, Rox – ВКО**.
 - Задать программу амплификации:

Таблица 10

Программа амплификации «ДНК ВПЧ 16-18»

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	45
	60	1 мин	Fam, Hex, Rox	

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	Fam, Hex, Rox	
	72	15 с	–	

и нажать **ОК**.

- Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **АмплиСенс-1**, указать количество образцов и нажать **ОК**.
- Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.
- 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! Следить 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 переворачивать стрипы/плашку при установке в прибор.

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

Обработка и анализ данных

По каналам Fam и Hex детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу Rox детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты тестирования интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ данных

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. Выставить параметры: **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %; Величина Threshold на участке линейного фитирования – 10 StD**.
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае, если это не так, то необходимо повысить уровень порога. Для этого внизу окна программы поставить галочку в поле Log_Y и, удерживая нажатой левую кнопку мыши, повысить уровень порога.
6. Нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат *.xls Excel либо *.rtf MS Word, выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.
7. Открыть сохраненный отчет и перенести данные в программу AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix. Для этого:
 - Удерживая нажатой левую кнопку мыши, выделить названия образцов в колонке **Идентификатор** отчета. Нажать правую кнопку мыши, в появившемся меню выбрать **Копировать**. Открыть программу AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix, в колонке **Обозначение** в ячейке, соответствующей образцу №1, нажать правую кнопку мыши. В появившемся меню выбрать **Вставить**.
 - Удерживая нажатой левую кнопку мыши выделить значения Ct образцов по каналу Fam в колонке **Cp_Fam** отчета. Нажать правую кнопку мыши, в появившемся меню выбрать **Копировать**. Нажать правую кнопку мыши в ячейке, соответствующей образцу №1 колонки **Fam** программы AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix, в появившемся меню выбрать **Вставить**.
8. Повторить процедуру для других флуоресцентных красителей.

При проведении качественного определения:

9. Установить режим **Качественный анализ**.
10. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в

матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix).

11. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

При проведении количественного определения:

12. Установить режим **Количественный анализ**, внутренняя калибровка.
13. Установить режим **Количественный анализ**, внутренняя калибровка.
14. Внести данные концентраций калибраторов в таблицу **Знач. калибр.** в соответствие с вкладышем к данной серии набора реагентов.
15. В столбце **Обозначение** проверить, что калибратор К1 имеет имя **К1**, калибратор К2 имеет имя **К2**, калибратор К3 имеет имя **К3** (без пробела между буквой К и цифрой), отрицательный контроль – **К-** или «-».
16. Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), слабopоложительный (**weak**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix). Далее в таблице отображаются количество 2n наборов геномов человека (отражает количество клеток) на реакцию, используется для оценки валидности образца. Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по генотипам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии с таблицей ниже:

Таблица 12

Интерпретация полученных результатов Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)

Результат Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

17. Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

Интерпретация результатов

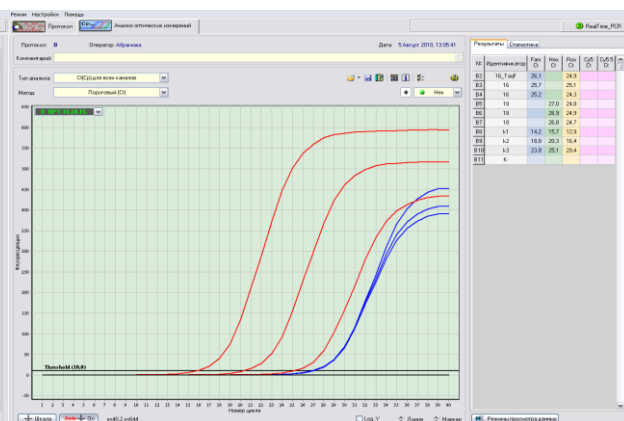
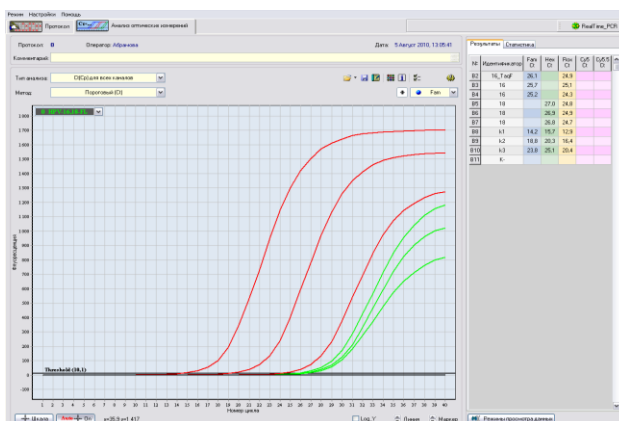
Значения, полученные для исследуемых образцов, подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для калибраторов, отрицательного контроля амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК:

- в отрицательном контроле экстракции (В–) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений C_t ,
- в отрицательном контроле ПЦР (К–) – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений C_t ,
- в калибраторах ВПЧ (К1, К2, К3) – **К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18** - должны появиться значения C_t по каждому каналу.

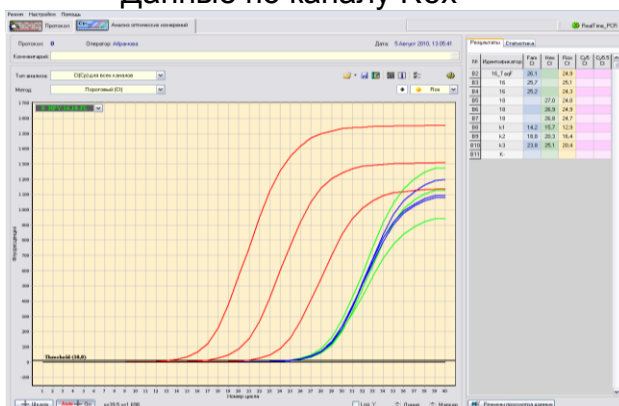
Пример полученных результатов

Данные по каналу Fam

Данные по каналу Hex



Данные по каналу Rox



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (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 тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (детекция через крышку пробирки).

ВНИМАНИЕ! Следить 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 переворачивать стрипы при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

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 – см. табл. 13, 14). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл** для варианта **FRT-100 F** или **30 мкл** для варианта **FRT**.

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

Таблица 13

Программа амплификации «ДНК ВПЧ 16-18»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	45
	60	1 мин	FAM, HEX, ROX	

Таблица 14

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX	
	72	15 с	–	

4. Сохранить протокол, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, и 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 все флуорофоры, используемые в данной постановке и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.
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**, выбрать директорию для сохранения файла постановки. Сохранить эксперимент.
8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Обработка и анализ результатов

По каналам FAM и HEX детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена).

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).

Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии, используя один из способов:

Вариант 1

Поочередно для каждого канала установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Вариант 2

Поочередно для каждого канала отметить галочкой **Log Scale**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер.

Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, возможно в появившемся окне задать название образцов и концентрации калибраторов.

Анализ данных

1. Щелкнуть правой кнопкой мыши на появившейся таблице с результатами. В выпадающем меню выбрать **Export to Excel**. Согласиться на сохранение файла. В случае если на компьютере установлена программа Microsoft Excel, данный файл откроется автоматически (если данная программа не установлена, дальнейшая обработка осуществляется на компьютере с Excel). Структура данного файла такова, что сначала последовательно следуют все результаты по каналу FAM, затем HEX и ROX.
2. Открыть прилагающийся к набору файл Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix (*программа расчета результатов*), согласиться на включение макроса.

Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.

3. В файле с результатами выделить и скопировать ячейки столбца со значениями пороговых циклов (**Cq**), соответствующие каналу FAM. Перейти к программе расчета результатов и вставить скопированные ячейки в столбец FAM, начиная с первой ячейки.
4. Аналогично скопировать ячейки столбца со значениями пороговых циклов (**Cq**), соответствующие каналу HEX и ROX в столбцы JOE и ROX программы расчета результатов.

5. Скопировать имена образцов из столбца **Sample** (если они обозначались) в столбец **Name** программы расчета.

При проведении качественного определения

- Установить режим **Качественный анализ**.
- Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix).
- Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

При проведении количественного определения

- Установить режим **Количественный анализ**, внутренняя калибровка.
- Внести данные концентраций калибраторов в таблицу **Знач. калибр.** в соответствие с вкладкой к данной серии набора реагентов.
- В столбце **Обозначение** проверить что калибратор K1 имеет имя **K1**, калибратор K2 имеет имя **K2**, калибратор K3 имеет имя **K3** (без пробела между буквой K и цифрой), отрицательный контроль – «**K-**» или «**-**».
- Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Результаты**. В колонке **Генотип** появятся выявленные в образцах генотипы ВПЧ, в колонке **Кач.** – результат исследования: положительный (**pos**), отрицательный (**neg**), слабopоложительный (**weak**), невалидный (**N/V**) (см. вкладку **Инструкция** в файле Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix). Далее в таблице отображается количество 2n наборов геномов человека (отражает количество клеток) на реакцию (используется для оценки валидности образца). Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10⁵ клеток по генотипам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии с таблицей ниже:

Интерпретация полученных результатов Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)

Результат Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

- Сохранить файл Microsoft Excel под другим именем.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Появление любого значения Ct по каналам FAM/Green/FAM-490, JOE/HEX/Yellow/JOE-530 и/или ROX/Orange/ROX-575 в таблице результатов для отрицательного контроля этапа ПЦР (К–) и/или для отрицательного контроля этапа экстракции (В–) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение Ct в таблице результатов для калибраторов ПЦР (К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18) по каналам FAM/Green/FAM-490, JOE/HEX/Yellow/JOE-530 и/или ROX/Orange/ROX-575 отсутствует, то необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК возбудителя.
3. Если для данного образца не определено значение порогового цикла Ct или оно превышает граничное значение по каналам FAM/Green/FAM-490 и/или JOE/HEX/Yellow/JOE-530, приводимое для ВПЧ 16 и 18 генотипов, а по каналу ROX/Orange/ROX-575 получено значение Ct , превышающее граничное значение, приводимое для ВКО, необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа экстракции. Возможная причина – ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК, или наличие ингибиторов ПЦР.