

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК вирусов
папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного
риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
типов в клиническом материале методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL»

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 ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).....	9

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL»** совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **2** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183), «ДНК-сорб-В» (РУ № ФСР 2009/05220), «ДНК-сорб-С» (РУ № ФСР 2008/03150), «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» (РУ № РЗН 2015/3503) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, 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 (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 крышку пробирки).

Установить пробирки в прибор строго согласно данной схеме планки:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
A	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
B												
C												
D												
E	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
F												
G												
H												

- Образцы размещаются по вертикали;
- Цвет соответствует условному цветовому обозначению ПЦР-смеси-1;
- Допускается использование не всех лунок прибора. В этом случае каждый образец должен занимать лунки, обозначенные A, B, C, D или E, F, G, H и должна сохраняться последовательность ПЦР-смесей 1.

ВНИМАНИЕ! При установке не оставлять пропусков между стрипами, контрольный стрип устанавливать последним.

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 **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**). Нажать **OK**.

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. ниже). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 13 мкл.**

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

Таблица 4

Программа амплификации «ВПЧ ВКР генотип» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Cycle 1	95	15 мин	–	1
Cycle 2	95	15 с	–	45
	60	50 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать **универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1».**

Таблица 5

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	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, Cy5	
	72	15 с	–	

4. Сохранить протокол, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить.** 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. Задать схему планшета. 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 в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр

Load должен быть отмечен галочкой.

6. Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**. 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 обработке результатов.

Обработка результатов

По каналам FAM, HEX и ROX детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу Cy5 детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с 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.

1. В окне **Data Analysis** 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 флюоресценции носят линейный характер.

2. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов.

Для формирования отчета о постановке в формате **.pdf** необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

3. Щелкнуть правой кнопкой мыши на положении A1 появившейся таблицы с результатами. Структура данного файла такова, что сначала последовательно следуют все результаты по каналу FAM/FAM-490, затем HEX/HEX-530 и ROX/ROX-575.
4. Открыть прилагающийся к набору файл Microsoft® Excel AmpliSens FRT HR HPV Genotype CFX Results Matrix .xls (*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.*

5. В программе расчета результатов во вкладке **Приборные данные** вставить скопированные данные в столбец **Well**, начиная с первой ячейки.
6. Во вкладке **AC HPV Genotype Results** с помощью таблицы **Панель управления** вставить данные со страницы **Приборные данные**.
7. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.
8. Нажать кнопку **Выдать результаты**. В колонке **Результаты** появятся выявленные в образцах типы ВПЧ.

Принципы, лежащие в основе автоматической обработки результатов:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов, а так же их присутствие или отсутствие анализируются программой автоматической обработки результатов.

Анализ результатов

Эксперимент считается *валидным* если:

- в отрицательных контролях положительный сигнал отсутствует по всем каналам FAM, HEX, ROX, Cy5.
- В положительном контроле выявляются все 12 типов ВПЧ.

ВНИМАНИЕ! В случае невалидности эксперимента все полученные данные считаются недостоверными, требуется повтор эксперимента.

Результат выявления ДНК ВПЧ и генотипирования для данного образца считается:

- *невалидным*, если хотя бы в одной пробирке стрипа не зарегистрировано ни одного положительного сигнала, в том числе нет сигнала внутреннего контроля (Cy5).
- *отрицательным*, если во всех четырех пробирках стрипа присутствует сигнал внутреннего контроля (канал Cy5) и отсутствуют сигналы по другим каналам (FAM, HEX, ROX).
- *положительным* – во всех остальных случаях.

ВНИМАНИЕ! Допускается отсутствие сигнала внутреннего контроля (канал Cy5) в данной пробирке стрипа, если в ней регистрируется сигнал/сигналы по каналам FAM, HEX, ROX.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («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 (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Установить пробирки в прибор строго согласно данной схеме плашки:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
A	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
B	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
E	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
H	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

- Образцы размещаются по вертикали;
- Цвет соответствует условному цветовому обозначению ПЦР-смеси-1;
- Допускается использование не всех лунок прибора. В этом случае каждый образец должен занимать лунки, обозначенные А, В, С, D или Е, F, G, H и должна сохраняться последовательность ПЦР-смесей 1.

ВНИМАНИЕ! При установке не оставлять пропусков между стрипами, контрольный стрип устанавливать последним.

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 **RealTime_PCR v.7.3** и выше. 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** на верхней панели выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста **ВПЧ-генотип** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – Пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль –;
 - **Контроли**: положительный (К+) – 4, отрицательный (К-) – 4;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 13 мкл;
 - **Флуорофоры** – FAM, HEX, ROX– специфика, Cy 5 – ВКО.
 - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Таблица 6

Программа амплификации «ВПЧ ВКР генотип» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Cycle 1	95	15 мин	–	1
Cycle 2	95	15 с	–	45
	60	50 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать **универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1»**.

Таблица 7

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	Время	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	
Cycling2/ Циклирование 2	95	5 с	40
	60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с	

4. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **ВПЧ -генотип**, указать количество образцов и нажать **ОК**
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку

напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.

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. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Обработка результатов

По каналам FAM, HEX и ROX детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу Cy5 детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с 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.

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: $C_t(C_p)$ для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (C_t)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**, **Величина Threshold на участке линейного фитирования – 10 StD**.
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого внизу окна программы

поставить галочку в поле **Log_Y** и, удерживая нажатой левую кнопку мыши, повысить уровень порога.

6. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат обработке только в том случае, когда получены следующие результаты прохождения контрольных образцов:
 - в отрицательном контроле (В-) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК ВПЧ и ДНК человека** – должно появиться значение *Ct* по всем каналам.
7. 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**.
8. Скопировать таблицу с данными по всем каналам в **Clipboard** путем нажатия правой кнопки мыши.
9. Открыть прилагающийся к набору файл Microsoft® Excel AmpliSens FRT HR HPV Genotype DT Results Matrix .xls (*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.*

10. В программе расчета результатов во вкладке **Приборные данные** вставить скопированные данные в столбец **Sample**, начиная с первой ячейки.
11. Во вкладке AC HPV Genotype Results с помощью таблицы **Панель управления** вставить данные со страницы **Приборные данные**.
12. Сохраните файл Microsoft® Excel под другим именем.
13. Нажмите кнопку **Выдать результаты**. В колонке **Результаты** появятся выявленные в образцах типы ВПЧ.

Принципы, лежащие в основе автоматической обработки результатов:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если

соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов, а так же их присутствие или отсутствие анализируются программой автоматической обработки результатов.

Анализ результатов

Эксперимент считается *валидным* если:

- в отрицательных контролях положительный сигнал отсутствует по всем каналам FAM, HEX, ROX, Cy5.
- В положительном контроле выявляются все 12 типов ВПЧ.

ВНИМАНИЕ! В случае невалидности эксперимента все полученные данные считаются недостоверными, требуется повтор эксперимента.

Результат выявления ДНК ВПЧ и генотипирования для данного образца считается:

- *невалидным*, если хотя бы в одной пробирке стрипа не зарегистрировано ни одного положительного сигнала, в том числе нет сигнала внутреннего контроля (Cy5).
- *отрицательным*, если во всех четырех пробирках стрипа присутствует сигнал внутреннего контроля (канал Cy5) и отсутствуют сигналы по другим каналам (FAM, HEX, ROX).
- *положительным* – во всех остальных случаях.

ВНИМАНИЕ! Допускается отсутствие сигнала внутреннего контроля (канал Cy5) в данной пробирке стрипа, если в ней регистрируется сигнал/сигналы по каналам FAM, HEX, ROX.