

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения ДНК

вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого

канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL»

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ 96» для варианта скрин-титр-FRT 4x (ДНК Технология, Россия)	3
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFХ96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)	10

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ 96» для варианта скрин-титр-FRT 4x (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, 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).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу RealTime_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. 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**.

Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** на верхней панели выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста «AS HPV SCREEN 4x» и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – Пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль+, контроль**;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл;
 - **Флуорофоры** – Fam – BKO; Hex, Rox, Cy5,5 – специфика
 - 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**.

Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов (ДТ 96)

Этап	Температура	Время	Измерение флуор.	Повторов
1	95 °С	15 мин	–	1
2	65 °С	2 мин	–	1
3	95 °С	20 с	–	5
	60 °С	25 с	–	
	65 °С	55 с	–	
4	95 °С	20 с	–	40
	60 °С	25 с	–	
	65 °С	55 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать **универсальную программу** амплификации и детекции **«АмплиСенс-1»**. С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП).

Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуор.	Повторов
<i>Hold/Удерж. темп-ры</i>	95	15 мин	–	1
<i>Cycling1/ Циклирование1</i>	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
<i>Cycling2/Циклирование2</i>	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **«AS HPV SCREEN 4x»**, указать количество образцов, нажать **ОК**.
4. 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**.
5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

Вариант FRT Форма 3: **REF** R-V31-T-2x(RG,iQ,SC), **REF** H-0533-1-1; Форма 4: **REF** R-V31-T-4x(RG,iQ,Mx),

REF H-0534-1-1 / **VER** 05.04.21 / стр. 4 из 14

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 переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.

7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Использование готового шаблонного файла для проведения теста

Для запуска прибора можно также использовать ранее созданный шаблон теста с заданными параметрами амплификации и заданным количеством контролей. Для этого:

- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**AS HPV SCREEN 4x**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
- 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**.
- в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов.

Обработка результатов

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
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**  и выставить:

- **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
- **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**.

Вариант FRT Форма 3: **REF** R-V31-T-2x(RG,iQ,SC), **REF** H-0533-1-1; Форма 4: **REF** R-V31-T-4x(RG,iQ,Mx),

REF H-0534-1-1 / **VER** 05.04.21 / стр. 5 из 14

5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) 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 установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K2 в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контрольного образца показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
6. Для дальнейшей работы с данными скопировать результаты значений *Ct* для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета в виде файла Word нажать кнопку **Отчет по результатам анализа** . Далее выбрать галочками параметры, необходимые для отображения в отчете, нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат **«*MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML»** и папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.
7. Открыть файл Microsoft® Excel «AmpliSens HR HPV SCREEN Quant 96 Results Matrix.xls» (*программа автоматической обработки результатов*), согласиться на включение макроса.
8. Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Рассчитать** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис > Макрос > Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.
9. В файле с результатами выделить и скопировать ячейки столбца «Threshold Cycle (Ct)», соответствующие каналу Fam. Перейдите к программе расчета результатов и вставить скопированные ячейки в столбец «Fam», начиная с первой ячейки.
10. Аналогично скопировать ячейки столбца «Threshold Cycle (Ct)», соответствующие каналу Hex, затем Rox и Cy5 в столбцы «Hex», «Rox» и «Cy5» программы расчета

результатов.

11. Скопировать имена образцов из столбца «Identifier» (если они обозначались) в столбец «Name»/«Имя» программы расчета.
12. В колонке «Name»/«Имя» программы расчета результатов обозначить образцы, соответствующие калибраторам строго как K1, K2 и K3, отрицательные контроли как «-» или «К-». Ячейки, не соответствующие экспериментальным пробиркам, – знаком #.
13. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.

Анализ результатов

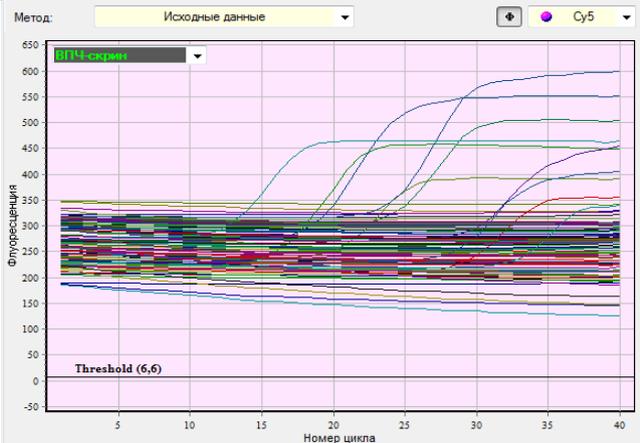
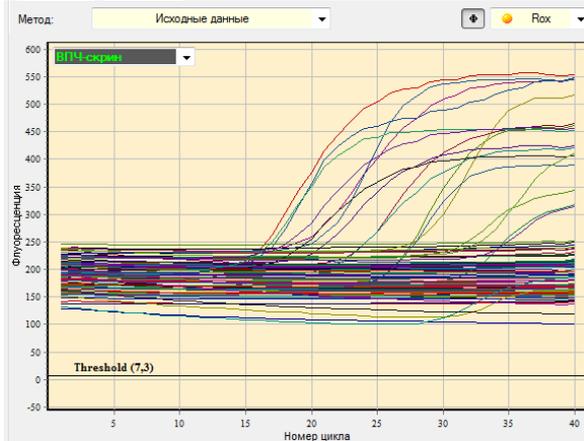
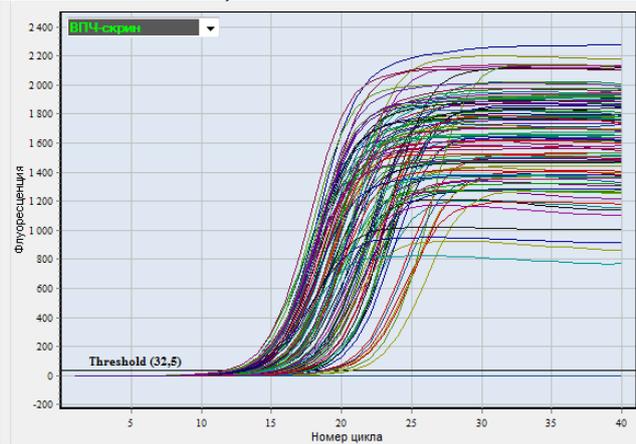
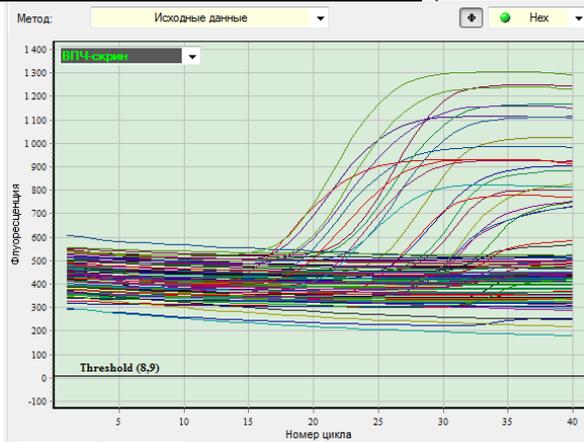
Анализ результатов осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажмите кнопку «Результаты». В колонке «Результаты» появятся выявленные в образцах филогенетические группы ВПЧ, результат: положительный (*pos*), отрицательный (*neg*), слабopоложительный (*weak*), невалидный (*N/V*). Далее в таблице отображается количество клеток на реакцию, которое используется для оценки валидности образца. Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по группам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии со следующим:

Результат Ig (копий ДНК 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

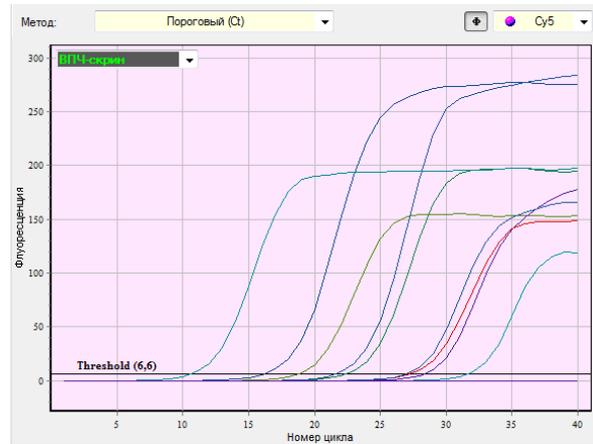
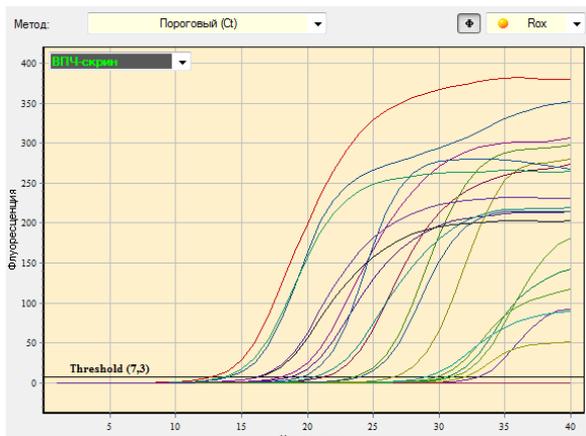
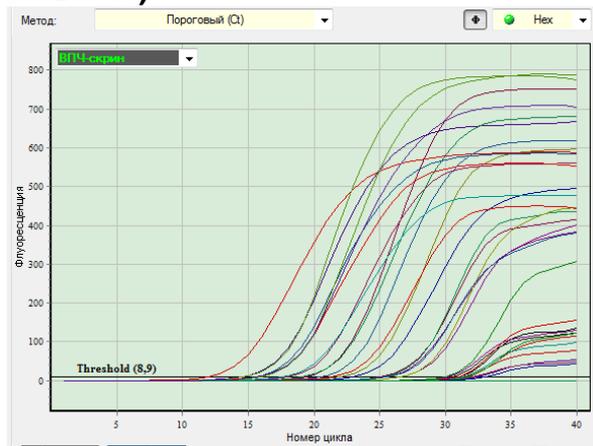
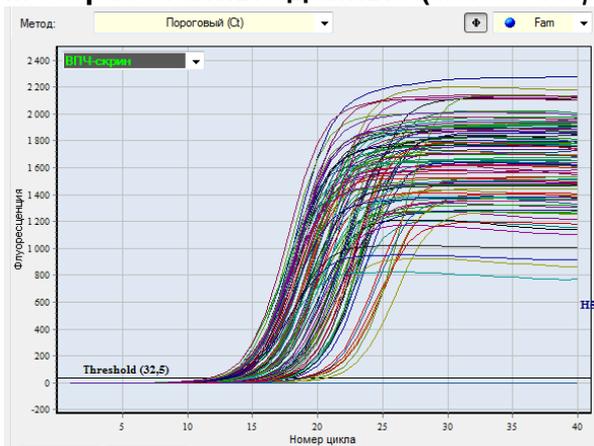
Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы RealTime PCR v.7.3.

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид)	Установить линию порога так, чтобы она пересекала только сигмообразные кривые накопления флуоресценции или на высоте $\frac{1}{4}$ от высоты между конечным значением флуоресценции отрицательных и положительных образцов
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца

I. Необработанные данные (Метод Исходные данные)



II. Обработанные данные (метод Пороговый Ct)



ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ 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 (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).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста:

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
2. 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 –25 мкл.**

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

Программа амплификации
ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	6
	65	55 с	–	
	Touchdown: 1 deg. per cycle			
65	25 с	–		
3	95	15 с	–	41
	60	55 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	65	25 с	–	

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1». С использованием этой программы можно одновременно

проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП).

Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество 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	–	

3. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
 4. 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.
 5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
 6. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.
- 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 пробирки (стрипы) при установке в прибор.
7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Использование готового шаблона для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

Обработка результатов

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

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 установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом

необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Чтобы выделить график образца «К+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

3. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов.
4. Для дальнейшей работы с данными можно скопировать результаты значений (*Ct*) для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. 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**.
6. Щелкнуть правой кнопкой мыши на положении A1 появившейся таблицы с результатами. Структура данного файла такова, что сначала последовательно следуют все результаты по каналу Cy5, FAM, затем HEX и ROX.
7. Открыть файл Microsoft® Excel AmpliSens FRT HR HPV SCREEN Quant 2x Results Matrix (для «ПЦР-комплекта» вариант скрин-титр-FRT 2x) или AmpliSens FRT HR HPV SCREEN Quant 4x Results Matrix (для «ПЦР-комплекта» вариант скрин-титр-FRT 4x), 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.*

8. В программе расчета результатов вставить скопированные данные в таблицу, последовательно в столбцы со значениями *Ct* по соответствующим каналам
9. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.

Анализ результатов

Анализ результатов осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажмите кнопку «Результаты». В колонке «Результаты» появятся выявленные в образцах филогенетические группы ВПЧ, результат: положительный (*pos*), отрицательный (*neg*), слабоположительный (*weak*), невалидный (*N/V*). Далее в таблице отображается количество клеток на реакцию, которое

используется для оценки валидности образца. Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по группам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии со следующим:

Результат Ig (копий ДНК 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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы Bio-Rad CFX Manager

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид в линейной шкале)	Установить линию порога на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контроля в последнем цикле амплификации (в логарифмической шкале)
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции (рис.)	Повторная амплификация для данного образца