

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для одновременного выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*), РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (*HIV-1*) и типа 2 (*HIV-2*) и ДНК вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *HCV / HBV / HIV-FL*»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ QIAasymphony SP (QIAGEN, Германия).	5
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)..	17

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ПО	- программное обеспечение
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>HCV</i>	- вирус гепатита С
<i>HBV</i>	- вирус гепатита В
<i>HIV-1</i>	- вируса иммунодефицита человека типа 1
<i>HIV-2</i>	- вируса иммунодефицита человека типа 2
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для одновременного выявления РНК вируса гепатита С (HCV), РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1) и типа 2 (HIV-2) и ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene Q (пять и более каналов) (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
 - Rotor-Gene 6000 (пять и более каналов) (Corbett Research, Австралия),
 - «ДТ-96» (пять каналов) (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия),
 - CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- а также совместно с автоматической станцией для выделения нуклеиновых кислот QIASymphony SP (QIAGEN, Германия).

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
Канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red
Канал для флуорофора Cy5.5	Cy5.5/Crimson/Quasar705

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ QIAsymphony SP (QIAGEN, Германия)

Версия программного обеспечения 3.5.

Порядок работы

1. Удостоверьтесь, что все отделения прибора находятся в закрытом положении. Если крышка открыта во время запуска станции, произойдет ошибка при запуске системы.
2. Включите электропитание в левом нижнем углу станции QIAsymphony SP. Появится стартовый экран. На мониторе будет отображаться процесс запуска станции.
3. Для того, чтобы работать в системе, необходимо войти в систему. Нажмите кнопку **Login/Вход в систему** в правом углу экрана. Выберите Ваше имя для входа в систему из списка. Появится экран **Keyboard/Клавиатура**. Введите Ваш пароль для входа в систему и нажмите **OK**. Вы вошли в систему, и Ваше имя пользователя отображается в строке состояния в нижней части экрана.
4. Реагенты для выделения нуклеиновых кислот содержатся в картриджах для реагентов. Каждый лоток картриджа содержит определенный реагент – магнитные частицы, лизирующий буфер, промывочный буфер или элюирующий буфер. Сборка картриджа с реагентами:
 - а) Положите держатель для картриджа с реагентами на твердую поверхность.
 - б) Выньте картридж с реагентами из комплекта реагентов QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit.
 - в) Вставьте картридж с реагентами в держатель.
 - г) Снимите фольгу с лотка с магнитными частицами.
 - д) Поместите штатив с ферментами в соответствующее отверстие на держателе картриджа с реагентами.



- е) Возьмите прокалывающую крышку и выньте ее из упаковки. Поместите крышку на картридж с реагентами.
- ж) Слегка надавите на прокалывающую крышку до щелчка, свидетельствующего о плотном закрытии.

ВНИМАНИЕ! Не встряхивайте картридж с реагентами, так как это может вызвать образование пены в буферных растворах, что приведет к ошибке в определении уровня жидкости.

ВНИМАНИЕ! Перед запуском протокола удостоверьтесь, что все магнитные частицы ресуспендированы. Перед использованием извлеките лоток с магнитными частицами из рамки, удерживающей картридж, тщательно встряхните в течение, по крайней мере, трех минут, и затем верните на место.

- з) После того, как крышка с лотка, содержащего магнитные частицы, удалена, и пробирки в штативе с ферментами открыты (завинчивающиеся крышки необходимо поместить в соответствующие пазы), собранный картридж помещается в секцию рабочего стола прибора ***Reagents and Consumables/Реагенты и расходные материалы***.
5. Загрузите необходимое количество картриджей с реагентами и расходных материалов (см. табл. 1) в секцию рабочего стола прибора ***Reagents and Consumables/Реагенты и расходные материалы*** и выполните учетное сканирование секции.

Таблица 1

Протокол	Virus Cellfree1000	
	Количество образцов	24
Картриджи с реагентами	1	2
Картриджи для пробоподготовки*	18	72
Одноразовые наконечники для магнитных стержней**	3	12
Наконечники объемом 1500 мкл***	105	402
Наконечники объемом 200 мкл***	28	104

Примечание – * Картриджи на 28 образцов в коробке,

** Двенадцать наконечников для магнитных стержней в коробке,

*** 32 наконечника/штатив.

6. Убедитесь, что секция **Waste/Отходы** подготовлена правильно, и выполните учетное сканирование секции, включая сброс и жидкие отходы. При необходимости замените мешок для использованных наконечников.
7. Загрузите необходимый штатив для элюции в секцию **Elution/Элюат**. Используйте слот для элюции №1 с соответствующим охлаждающим адаптером.
8. Приготовьте смесь из ВКО STI-87-rec, РНК-носителя и буфера AVE (флакон 20 мл), исходя из расчетов, представленных в таблице 2. Приготовление смеси проводить строго в полистироновых круглодонных пробирках 17 x 100 мм, объемом 14 мл производства **Becton, Dickinson and Company** (каталожный номер 352051).

ВНИМАНИЕ! Перед первым использованием набора реагентов необходимо развести РНК-носитель. Для получения раствора с концентрацией 1 мкг/мкл добавьте в пробирку, содержащую 1350 мкг лиофилизированного препарата РНК-носителя, 1350 мкл буфера AVE (флакон 2 мл). Тщательно растворите РНК-носитель перемешиванием на вортексе, разделите на аликвоты подходящего объема и храните при температуре не выше минус 20 °С. Не подвергайте аликвоты замораживанию-оттаиванию более двух раз.

Количество исследуемых образцов	Количество РНК-носителя с концентрацией 1 мкг/мкл, (мкл)	Объем ВКО STI-87-rec, (мкл)	Объем буфера AVE, (мкл)	Суммарный объем, (мкл)
1	5	10	105	120
12*	90	180	1870	2140
24*	150	300	3130	3580
36*	210	420	4390	5020
48*	270	540	5650	6460
60*	330	660	6910	7900
72*	390	780	8170	9340
84*	450	900	9430	10780
96*	510	1020	10690	12220

Примечание – * Объем компонентов рассчитан с учетом необходимого запаса.

9. Пробирку, содержащую смесь «ВКО STI-87-rec – РНК-носитель – буфер AVE», необходимо поместить в паз «А» секции **Образец/Sample**.
 10. Статус внутреннего контроля изменится с **READY TO LOAD/ГОТОВ К ЗАГРУЗКЕ** на **LOADED/ЗАГРУЖЕНО**. Система автоматически определяет количество загруженных пробирок и их позиции в штативе. Загруженные пробирки отображаются на экране как **Unknown IC/Неизвестные ВКО**. При помощи сенсорного экрана выделите пробирку и выберите для нее используемый протокол выделения **Virus Cellfree1000** в меню **Optional**. Цветовой статус пробирки сменится с желтого на синий, далее нажмите **Ок**.
 11. Поместите образцы в штативы QIASymphony и загрузите штативы в пазы «1-4» секции **Образец/Sample**. Статус позиции для штатива изменится с **READY TO LOAD/ГОТОВ К ЗАГРУЗКЕ** на **LOADED/ЗАГРУЖЕНО**.
- ВНИМАНИЕ!** Объем исследуемых образцов должен быть **не менее 1050 мкл**, образцы не должны содержать сгустков и посторонних частиц.
12. При наличии штрих-кода на пробирке происходит его автоматическое считывание во время загрузки штатива. Если образцы не маркированы штрих-кодом, им необходимо присвоить виртуальный штрих-код в меню программы. Выделите исследуемые образцы и выберите для них используемый протокол выделения **Virus Cellfree1000**. Цветовой статус пробирок сменится с желтого на синий, далее нажмите **Ок**.

13. Во вкладке **Sample preparation (Приготовление образца)/Elution Slot (Слот для элюции)/Configure Racks (Конфигурировать подставки)** необходимо выбрать тип используемых для элюции планшетов/пробирок, **объем элюции 60 мкл** и порядок расположения образцов в планшетах/пробирках для элюции. Далее нажать **Ок**.
14. Нажмите кнопку **Пуск** для запуска процесса. Все стадии процесса выполняются полностью автоматически. По окончании протокола статус партии сменится с **Выполняется** на **Завершено**.
15. Выньте из секции **Элюат** рабочего стола прибора штатив с очищенными нуклеиновыми кислотами. Нуклеиновые кислоты готовы к использованию, либо подлежат хранению. Для кратковременного хранения (до 24 ч) рекомендуется держать очищенные нуклеиновые кислоты при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения (более 24 ч) рекомендуется держать при температуре не выше минус 20 °С.

ВНИМАНИЕ! Если картридж с реагентами использован частично, сразу после окончания протокола закупорьте его прилагаемыми уплотнительными полосками, а также закройте завинчивающимися крышками пробирки с ферментами для предотвращения испарения.

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

Для работы с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q следует использовать программу программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

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

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 плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки или стрипы в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*). Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных наборов реагентов или с разными ПЦР-смесями-FL, то в программе Rotor-Gene необходимо указать номера пробирок для калибровки по каждому каналу детекции. Рекомендации по калибровке изложены в информационном листе «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)».

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.

2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. 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 одето фиксирующее кольцо. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 50 мкл. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры (см. табл. 3):

Таблица 3

**Программа амплификации «АмплиСенс HBV / HCV / HIV»
для приборов роторного типа**

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	20 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	4
	46	40 с	–	
4	95	5 с	–	42
	60	40 с	–	
	45	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red Cy5,5/Crimson	

6. Нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**
 - осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5,5/Crimson (нажать кнопку **Optimise Acquiring/Опт. Детектых**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - установка калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперименту и сохранить его (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
10. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК HCV (канал FAM/Green):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона – ПФ**) указанное во вкладке к набору реагентов.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК HIV-1 (канал JOE/Yellow):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/ Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.

5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона– ПФ**) указанное во вкладке к набору реагентов.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК *HBV* (канал ROX/Orange):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона – ПФ**) указанное во вкладке к набору реагентов.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК *HIV-2* (канал Cy 5,5/Crimson):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. Cy5,5/Cycling A. Crimson, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона – ПФ**) указанное во вкладке к набору реагентов.

6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал Cy5/Red):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. Cy5/Cycling A. Red, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
5. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона – ПФ**) указанное во вкладыше к набору реагентов.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct* для ВКО.

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.

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 – «**НСV-НВV-НIV-FL**» и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - Тип – качественный;
 - Метод – Пороговый (Ct);
 - Пробирки – образец, контроль +, контроль –;
 - Контроли: положительный (K+) – 1 , отрицательный (K-) – 1;
 - Объем рабочей смеси в пробирке – 50 мкл;
 - Флуорофоры: FAM – специфика; R6G – специфика; ROX – специфика; Cy5 – BK; Cy5,5 – специфика;
 - Задать программу амплификации (см. табл. 4) и нажать **ОК**.

Таблица 4

**Программа амплификации «АмплиСенс HBV / HCV / HIV»
для приборов планшетного типа**

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	20 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	4
	46	40 с	–	
4	95	5 с	–	42
	60	40 с	–	
	40	40 с	Fam, R6G/Hex, Rox, Cy5, Cy5,5	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**НСV-НВV-НIV1-НIV2-FL**», указать количество образцов и нажать **ОК**.
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.

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

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

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

Анализ результатов

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс)** для версии программы v.7.5. и выше).
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР** – в соответствии со значением, указанным во вкладыше к набору реагентов.
 - **Критерии достоверности результата:** поставить галочку, выставить значения «нижней границы / порога положительного результата» и «верхней границы / порог нормализации данных» в соответствии со вкладышем к набору реагентов.
 - **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).

Нажать кнопку **Применить**

5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Ф** (отжать кнопку).
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
7. Нажать кнопку **Отчет по результатам анализа**. В таблице результатов появятся значения **Ct** для всех каналов флуоресцентной детекции.

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! Следите за тем, чтобы на стенках микропробирок 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.

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**)
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor - New** задать параметры амплификации (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала – см. табл. 5). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 50 мкл**.

Таблица 5

Программа амплификации «АмплиСенс HBV/HCV/HIV» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	20 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	4
	46	40 с	–	
4	95	5 с	–	42
	60	40 с	–	
	40	40 с	FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar 705	

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

1	50,0 C for 20:00
2	95,0 C for 15:00
→ 3	95,0 C for 0:20
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	46,0 C for 0:40
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 3 , 3 more times
→ 6	95,0 C for 0:05
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7	60,0 C for 0:40
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8	40,0 C for 0:40
	+ Plate Read
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
→ 9	GOTO 6 , 41 more times
	END

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.
8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на

соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов).

Во вкладке «**Quantification**» представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

- FAM – HCV;
- HEX – HIV-1;
- ROX – HBV;
- Cy.5 – BK;
- Quasar 705 – HIV-2.

Для установки уровня пороговой линии необходимо поочередно для каждого канала отметить галочкой **Log Scale**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер. Снять галочку с **Log Scale**.

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

Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.