

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2)
вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Influenza virus A*-тип-FL»

Вариант FRT

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/ 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА SmartCycler II (SERNEID, США)	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ или iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)	25

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A-тип-FL*» вариант FRT совместно с приборами для ПЦР в реальном времени:

- Rotor-Gene 3000 (три и более каналов) (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene 6000 (пятисканальный, шестисканальный) (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай),
- SmartCycler II (CERTEID, США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия),
- iCycler iQ или iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США),
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).

Перед проведением реакции амплификации необходимо провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов и в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Соответствие наименования ПЦР-смесь-1 и каналов детекции

Наименование ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Детекция по каналу		
	FAM/Green	JOE/HEX/ Yellow/Cy3	ROX/Orange/ Texas Red
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H1</i>	<i>Influenza virus A N1</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H1</i>	<i>Influenza virus A N1</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H3</i>	<i>Influenza virus A N2</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H3</i>	<i>Influenza virus A N2</i>

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)

При использовании прибора Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки).

Поместить пробирки в ячейки ротора прибора Rotor-Gene 3000/6000/Q 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! Не рекомендуется одновременная постановка реакций по идентификации субтипов H1N1 и H3N2.

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

Программирование амплификатора:

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор**, и отметить, что вы не используете пробирки с круглыми крышками (Rotor-Gene 3000) /одето фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Для прибора Rotor-Gene 6000 установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. 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. 2а или 2б):

**Программа амплификации для формы комплектации 1 –
«ПЦР-комплект» вариант FRT**

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	5 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	–	10
	54	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 с	–	

**Программа амплификации для формы комплектации 2 – «ПЦР-комплект»
вариант FRT-100 F**

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	–	10
	54	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 с	–	

6. Нажать кнопку **ОК/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 и ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/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 эксперимента и сохранить его на диске (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**.

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green (ВКО):

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**) должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,1**.
5. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **0 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации по каналу 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 кнопку **Dynamic tube/Динамич.фон**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии:
 - для теста «H1N1» **Threshold/Порог = 0,1**;
 - для теста «H3N2» **Threshold/Порог = 0,05**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным 5 %.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации по каналу 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/Коррек. Уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,1**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным 5 %.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 3). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в таблице 3 для приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q.

Результаты анализа контрольных образцов для приборов Rotor-Gene 3000/6000/Q

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange
		Детекция ВКО	Детекция гена-мишени (H1/H3)	Детекция гена-мишени (N1/N2)
ОК	Экстракция РНК	< 28	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 26	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> H1N1	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> H3N2	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/H1 (или A/H3), если имеется значение *Ct* по каналу JOE/Yellow.

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1 (или A/N2), если имеется значение *Ct* по каналу ROX/Orange.

Если в исследуемом образце отсутствуют значения *Ct* по обоим или одному из каналов (JOE/Yellow и ROX/Orange), а значение *Ct* по ВКО не превышает порогового значения для детекции ВКО (канал FAM/Green) (см. таблицу 4), следует считать, что в этом образце данный субтип A/H1N1 (или A/H3N2) эпидемического вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).

Интерпретация результатов в исследуемых образцах для приборов Rotor-Gene 3000/6000/Q

ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange
	Детекция ВКО	Детекция гена-мишени (H1/H3)	Детекция гена-мишени (N1/N2)
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i> H1N1	ВК<28	<i>H1</i> ≤ 35	<i>N1</i> ≤ 35
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A</i> H1N1	ВК<28	<i>H1</i> ≤ 35	<i>N1</i> ≤ 35
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i> H3N2	ВК<28	<i>H3</i> ≤ 35	<i>N2</i> ≤ 35
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A</i> H3N2	ВК<28	<i>H3</i> ≤ 35	<i>N2</i> ≤ 35

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу детекции гена-мишени определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен *данный ген-мишень*, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

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

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА SmartCycler II (CERNEID, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов (см. пункт Б2. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F). При использовании прибора рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок на 0,025 мл (CERNEID, США). Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу к прибору Smart Cycler II. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.

Программирование амплификатора:

1. В основном меню программы выбрать **Define Protocols**. В открывшемся окне выбрать в нижнем левом углу экрана кнопку **New Protocol**, дать название протоколу и задать параметры эксперимента в соответствии с табл. 5.

Таблица 5

Программа амплификации для формы комплектации 2 – «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Stage1 Hold	95	900 с	–	1
Stage 2 2-Temperature Cycle	95	15 с	–	42
	54	25 с	FAM, Cy3, Texas Red	
	72	25 с	–	

2. Включить измерение флуоресцентного сигнала на втором шаге (54 °С). Для этого щелкнуть на ячейке Optics второго шага и выбрать **ON**.
3. В нижней части окна нажать кнопку **Save Protocol**.
4. Нажать кнопку **Create Run** в основном меню программы. В окне **Run Name** нужно ввести имя файла, в котором будут сохранены все данные эксперимента. В центральной части левой панели экрана нажать стрелку **Dye set** и в ниспадающем меню выбрать комбинацию красок **FCTC25**.
5. В центре экрана нажать кнопку **Add/Remove Sites** и в появившемся окне выбрать нужный протокол (программу) и ячейки, в которых будет проводиться анализ. Нажать кнопку **OK**.
6. В таблице в верхней половине окна перечислены установки анализа данного эксперимента. В этой таблице для каждого образца в столбце **Sample Type** по

умолчанию указан тип образца UNKN (неизвестный). В колонке **Sample ID** дается название каждому образцу.

7. Запустить выполнение программы эксперимента кнопкой **Start Run** в нижней части экрана.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 6). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в таблице 6 для прибора Smart Cycler II.

Таблица 6

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа на приборе Smart Cycler II

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM	Cy3	Texas Red
		Детекция ВКО	Детекция Гена-мишени (H1/H3)	Детекция Гена-мишени (N1/N2)
OK	Экстракция РНК	< 38	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
K-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
BK+	ПЦР	< 36	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО кДНК <i>Influenza virus</i> A H1N1	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 35	< 35
ПКО кДНК <i>Influenza virus</i> A H3N2	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 35	< 35

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/H1 (или A/H3), если имеется значение *Ct* по каналу Cy3.

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1 (или A/N2), если имеется значение *Ct* по каналу Texas Red.

Если в исследуемом образце отсутствуют значения *Ct* по обоим или одному из каналов (Cy3 и Texas Red), а значение *Ct* по ВКО не превышает порогового значения для детекции ВКО (канал FAM) (см. таблицу 7), следует считать, что в этом образце данный субтип A/H1N1 (или A/H3N2) эпидемического вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).

**Интерпретация результатов в исследуемых образцах
для прибора Smart Cycler II**

ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM	Су3	Texas Red
	Детекция ВКО	Детекция гена-мишени (H1/H3)	Детекция гена-мишени (N1/N2)
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВК<38	$H1 \leq 42$	$N1 \leq 42$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВК<38	$H3 \leq 42$	$N2 \leq 42$

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу детекции гена-мишени определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен *данный ген-мишень*, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

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 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 осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Включить прибор и запустить программу **ДТ-96 v.7.3**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
3. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
4. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип – качественный**
 - **Метод – Пороговый (Ct)**
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец**
 - **Контроли** – нет
 - **Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл**
 - **Флуорофоры – FAM - ВК; HEX – специфика; ROX – специфика.**
5. Задать программу амплификации с применением команды **Создать новую программу/редактировать программу** (см. табл. 8а, б).

Таблица 8а

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» вариант FRT

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	Fam, Hex, Rox	
	72	25 с	–	

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» вариант FRT 100F.

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	Fam, Hex, Rox	
	72	25 с	–	

6. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать соответствующее название теста, указать количество образцов и нажать **ОК**.
7. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне **Свободное заполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
8. Указать **Объем рабочей смеси - 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
9. 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.

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

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Обработка 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. Отключить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Φ** (отжать кнопку).
5. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. В открывшейся вкладке установить **Критерий положительного результата ПЦР – 90%, Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного**

результата – 10%, верхняя граница/порог нормализации данных – 30%.

Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку **Применить**.

6. Поочередно для каналов Fam, Hex и Rox установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на уровне 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо чтобы график флуоресценции для ПКО показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной смеси. Допускается одновременная постановка с другими тестами из линейки Influenza.

Нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку «Мои документы»), выбрать формат ***MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML**, выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 9). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в табл. 9 для прибора «ДТ-96» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Таблица 9

Результаты анализа контрольных образцов для прибора ДТ-96

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		Fam	Hex	Rox
		Детекция ВКО	Детекция Гена-мишени (H1/H3)	Детекция Гена-мишени (N1/N2)
ОК	Экстракция РНК	< 28	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 26	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО кДНК Influenza virus A H1N1	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25
ПКО кДНК Influenza virus A H3N2	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/H1 (или A/H3), если имеется значение *Ct* по каналу Hex.

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1 (или A/N2), если имеется значение *Ct* по каналу Rox.

Если в исследуемом образце отсутствуют значения *Ct* по обоим или одному из каналов (Hex и Rox), а значение *Ct* по ВКО не превышает порогового значения для детекции ВКО (канал Fam) (см. таблицу 10), следует считать, что в этом образце данный субтип A/H1N1 (или A/H3N2) эпидемического вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).

Таблица 10

Интерпретация результатов в исследуемых образцах для прибора ДТ-96

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	Fam	Hex	Rox
	Детекция ВКО	Детекция Гена-мишени (H1/H3)	Детекция Гена-мишени (N1/N2)
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВК<28	$H1 \leq 35$	$N1 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВК<28	$H1 \leq 35$	$N1 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВК<28	$H3 \leq 35$	$N2 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВК<28	$H3 \leq 35$	$N2 \leq 35$

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу детекции гена-мишени определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить исследование для всех

образцов, в которых обнаружен *данный ген-мишень*, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ или 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 (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 осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Открыть программу iCycler или iQ5 в зависимости от используемого прибора.
3. Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE/HEX и ROX**.
 - Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Редактируйте схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. Задайте объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохраните заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
 - Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого 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 использованную ранее схему планшета, 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**.

4. Задать программу амплификации (см. табл. 11 а, б).

Таблица 11а

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» вариант FRT

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	72	25 с	–	

Таблица 11б

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» вариант FRT 100F

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Задайте параметры амплификации и сохраните 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 модели **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: Cycle 3 – Step 2. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2;

Форма 2: **REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 24.03.21 / стр. 20 из 29

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**.

5. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета.
 - Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует 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 эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
 - Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует 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 запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
6. После того, как температура реакционного блока достигнет 95 °С, нажать кнопку **Pause**, открыть крышку и поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора и нажать кнопку **Resume Run** (для прибора **iCycler iQ** – кнопку **Continue Running Protocol**).
7. 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).

Для всех каналов FAM, JOE/HEX и ROX уровень пороговой линии необходимо установить (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для ПКО показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Накопление продукта амплификации участка ВКО детектируется по каналу FAM, участка кДНК *Influenza virus A/H1 (A/H3)* по каналу JOE/HEX, накопление продукта амплификации кДНК *Influenza virus A/N1 (A/N2)* – по каналу ROX.

Анализ результатов амплификации ВКО

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Установить уровень пороговой линии. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов кДНК *Influenza virus A/H1 (A/H3)*

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE/HEX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Установить уровень пороговой линии. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Lybrary** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyse Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A/N1 (A/N2)*

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **ROX**, отключив кнопки **FAM** и **JOE/HEX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Установить уровень пороговой линии. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **ROX-575**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 12). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в табл. 12 для приборов **iCycler iQ** или **iQ5 (BioRad, США)**.

Таблица 12

**Результаты анализа контрольных образцов
для приборов iCycler iQ или iQ5 (Bio-Rad, США)**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM	JOE/HEX	ROX
ОК	Экстракция РНК	< 28	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 26	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> H1N1	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> H3N2	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа А/Н1 (или А/Н3), если

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2;

Форма 2: **REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 24.03.21 / стр. 23 из 29

имеется значение C_t по каналу JOE/HEX.

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1 (или A/N2), если имеется значение C_t по каналу ROX.

Если в исследуемом образце отсутствуют значения C_t по обоим или одному из каналов (JOE/HEX и ROX), а значение C_t по ВКО не превышает порогового значения для детекции ВКО (канал FAM) (см. **таблицу 13**), следует считать, что в этом образце данный субтип A/H1N1 (или A/H3N2) эпидемического вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).

Таблица 13

**Интерпретация результатов в исследуемых образцах
для приборов iCycler iQ или iQ5 (Bio-Rad, США)**

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM	JOE/HEX	ROX
	Детекция ВКО	Детекция Гена-мишени (H1/H3)	Детекция Гена-мишени (N1/N2)
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВК<28	$H1 \leq 35$	$N1 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВК<28	$H1 \leq 35$	$N1 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВК<28	$H3 \leq 35$	$N2 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВК<28	$H3 \leq 35$	$N2 \leq 35$

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу детекции гена-мишени определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен *данный ген-мишень*, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

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 (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

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. 14 а, б). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Таблица 14а

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» вариант FRT

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, HEX, ROX	
	72	25 с	–	

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, HEX, ROX	
	72	25 с	–	

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

1. 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.
2. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, подтверждая название каждого образца кнопкой **Load**.
3. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать Сохранить.
4. 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.

5. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета,

Вариант FRT Форма 1: [REF] R-V54, [REF] H-1021-1-2;

Форма 2: [REF] R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), [REF] H-1022-1 / [VER] 24.03.21 / стр. 26 из 29

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**.

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 *Ct* в соответствующей графе таблицы 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.

Поочередно для каждого канала FAM, HEX и ROX 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 необходимо, чтобы график флуоресценции для ПКО показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной смеси. Допускается одновременная постановка с другими тестами из линейки Influenza.

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

Накопление продукта амплификации участка ВКО детектируется по каналу FAM, участка кДНК *Influenza virus A/H1 (A/H3)* по каналу HEX, накопление продукта амплификации кДНК *Influenza virus A/N1 (A/N2)* – по каналу ROX.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 15). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в табл. 15 для прибора **CFX96 (BioRad, США)**.

Таблица 15

Результаты анализа контрольных образцов для прибора CFX96 (Bio-Rad, США)

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM	HEX	ROX
		Детекция ВКО	Детекция Гена-мишени (H1/H3)	Детекция Гена-мишени (N1/N2)
OK	Экстракция РНК	< 28	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 26	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H1N1</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H3N2</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/H1 (или A/H3), если имеется значение *Ct* по каналу HEX.

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1 (или A/N2), если имеется значение *Ct* по каналу ROX.

Если в исследуемом образце отсутствуют значения *Ct* по обоим или одному из каналов (HEX и ROX), а значение *Ct* по ВКО не превышает порогового значения для детекции ВКО (канал FAM) (см. таблицу 16), следует считать, что в этом образце данный субтип A/H1N1 (или A/H3N2) эпидемического вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).

**Интерпретация результатов в исследуемых образцах
для прибора CFX96 (Bio-Rad, США)**

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM	HEX	ROX
	Детекция ВКО	Детекция Гена-мишени (H1/H3)	Детекция Гена-мишени (N1/N2)
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВК<28	$H1 \leq 35$	$N1 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВК<28	$H1 \leq 35$	$N1 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВК<28	$H3 \leq 35$	$N2 \leq 35$
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВК<28	$H3 \leq 35$	$N2 \leq 35$

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу детекции гена-мишени определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен *данный ген-мишень*, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.