

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ): РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus – hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus – hMpv*), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus-1-4 – hPiv*), коронавирусов (*human Coronavirus – hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus – hRv*), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (*human Adenovirus В, С, Е – hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus – hBov*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

Вариант FRT

«АмплиСенс[®] ОРВИ-скрин-FL»

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
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).....	5
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).....	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ОРВИ	- Острые респираторные вирусные инфекции
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
РНК	- Рибонуклеиновая кислота
ДНК	- Дезоксирибонуклеиновая кислота
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
кДНК	- Комплементарная ДНК получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ПКО	- Положительный контрольный образец
ВКО STI-rec	- Внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ОК	- Отрицательный контроль экстракции (выделения) РНК/ДНК
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
К+	- Положительный контроль ПЦР
ВК+	- Положительный контроль амплификации образца ВКО STI-rec

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и идентификации возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ): РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus – hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus– hMpv*), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus-1-4 – hPiv*), коронавирусов видов OC43, E229, NL63, HKU1 (*human Coronavirus – hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus – hRv*), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (*human Adenovirus – hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus – hBov*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией – **«АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»** совместно с приборами для ПЦР в реальном времени:

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

**Соответствие наименования ПЦР-смесей-1-FL и каналов детекции
возбудителей ОРВИ**

Наименование ПЦР-смеси-1-FL	Детекция по каналу		
	FAM/Green	JOE/HEX/Yellow	ROX/Orange
	Детекция ВКО	Детекция возбудителя	Детекция возбудителя
<i>hRSv-hMpv</i>	ВК	<i>hRSv</i>	<i>hMpv</i>
<i>hAdv-hBov</i>	ВК	<i>hBov</i>	<i>hAdv</i>
<i>hRv</i>	ВК	–	<i>hRv</i>
<i>hPiv 1/3</i>	ВК	<i>hPiv3</i>	<i>hPiv1</i>
<i>hPiv 2/4</i>	ВК	<i>hPiv2</i>	<i>hPiv4</i>
<i>hCov</i>	ВК	<i>NL-63, 229E</i>	<i>HKU-1, OC 43</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)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При работе с приборами 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) или пробирок на 0,1 мл.

Поместить микропробирки 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.

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** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. 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 эксперименту. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры (см. табл. 2 а,б):

Таблица 2а

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» 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	–	

Таблица 2б

Программа амплификации для «ПЦР-комплекта» 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 **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 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**);
- Установить калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

ВНИМАНИЕ! При одновременной амплификации разных наименований ПЦР-смеси-1-FL для калибровки **не использовать** пробирки с ПЦР-смесью-1-FL *hRv*.

8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

9. Дать название эксперименту 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 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:

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. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить 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 **Threshold/Порог = 0.1**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить 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 установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным **5 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения «Ct».

ВНИМАНИЕ!

- для анализа результатов реакции амплификации кДНК Parainfluenza virus тип 1 и кДНК human Coronavirus (канал ROX/Orange) кнопка **Slope Correct/Коррек. Уклона** должна быть неактивна. Для кДНК Parainfluenza virus тип 1 значение параметра **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** составлять **10 %**.
- для анализа результатов реакции амплификации кДНК Parainfluenza virus тип 3 (канал JOE/Yellow) кнопка **Slope Correct/Коррек. Уклона** должна быть активна, а значение параметра **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** должно составлять **10 %**.
- для анализа результатов реакции амплификации ДНК human Adenovirus – hAdv (канал ROX/Orange) значение параметра **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** должно составлять **3 %**, а уровень пороговой

линии Threshold/Порог = **0.05**.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

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

Таблица 3

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange
		Детекция ВКО STI-rec	Детекция возбудителя	Детекция возбудителя
Для всех ПЦР-смесей-1-FL				
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
OK	Экстракция РНК/ДНК	< 30	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 29	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
Для соответствующей ПЦР-смеси-1-FL				
К+ <i>hRSv-hMpv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 24	< 24
К+ <i>hAdv-hBov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 22	< 24
К+ <i>hRv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	–	< 21
К+ <i>hPiv1/3</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 24	< 24
К+ <i>hPiv2/4</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 24	< 24
К+ <i>hCov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 22	< 22

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

- Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналам **JOE/Yellow** или/и **ROX/Orange** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 4).
- Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow** или/и **ROX/Orange** для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу FAM/Green для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 4).
- Образец считается невалидным**, если для него не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по всем каналам детекции возбудителей ОРВИ, и по каналу FAM/Green значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции

Вариант FRT Форма1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,iQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 25.03.21 / стр. 9 из 27

РНК/ДНК.

4. **Образец считается сомнительным**, если в таблице результатов по каналам **JOE/Yellow** или/и **ROX/Orange** для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 4). Образцы, для которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу результат считается сомнительным.

Таблица 4

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

ПЦР-смесь-1-FL	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange
	Детекция ВКО STI-rec	Детекция возбудителя	Детекция возбудителя
<i>hRSv-hMpv</i>	< 30	<i>hRSv</i> < 28	<i>hMpv</i> < 31
<i>hAdv-hBov</i>	< 30	<i>hBov</i> < 28	<i>hAdv</i> < 31
<i>hRv</i>	< 30	–	<i>hRv</i> < 27
<i>hPiv 1/3</i>	< 30	<i>hPiv3</i> < 31	<i>hPiv1</i> < 30
<i>hPiv 2/4</i>	< 30	<i>hPiv2</i> < 30	<i>hPiv4</i> < 30
<i>hCov</i>	< 30	<i>NL-63, 229E</i> < 30	<i>HKU-1, OC43</i> < 30

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

- Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для К+ значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение порогового цикла, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
- Если для ОК и/или К- по каналу детекции возбудителя определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК/ДНК *данного возбудителя*, 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, 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 дно пробирки).

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

ВНИМАНИЕ! Не допускается одновременная постановка теста «*Rhinovirus*» с другими тестами набора «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» на приборах iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США).

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

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/iQ5.
3. Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE/HEX и ROX**.

ВНИМАНИЕ! Для теста «*Rhinovirus*» (*hRv*) необходимо использовать только каналы **FAM** и **ROX**. Не допускается одновременная постановка теста «*Rhinovirus*» с другими тестами набора «АмплиСенс® ОРВИ скрин-FL» на приборах iQ iCycler и iQ5 (Bio-Rad, США).

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета возможно в режиме **Whole Plate loading**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) **25** мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить 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, JOE/HEX** и **ROX**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней

части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

4. Задать программу амплификации (см. табл. 5 а,б).

Таблица 5а

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, JOE/HEX, ROX	
	72	25 с	–	

Таблица 5б

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, JOE/HEX, ROX	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать 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 прибора **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** (файл с расширением «.tmo») и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную

программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

5. Поместить предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

ВНИМАНИЕ! Необходимо следить 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 переворачивать стрипы/плашку при установке в прибор.

- 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 эксперименту (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 эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Обработка и анализ данных

Результаты анализируются на основании наличия (или отсутствия) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна иметь выраженную S-образную форму на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции и однократно пересекать пороговую линию.

ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси-1.

Обработка данных

- 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 соответствующему каналу. При этом должен быть выбран режим анализа

данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Поочередно для каналов FAM, JOE/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 кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем. 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 соответствующего канала. 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**. Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Поочередно для каналов FAM, JOE/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 кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем. 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. 6). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в **табл. 6** для приборов iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США).

Поочередно для каналов FAM, JOE/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 кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного

экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Таблица 6

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM	JOE/HEX	ROX
		Пороговое значение для детекции ВКО STI-rec	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя
Для всех ПЦР-смесей-1-FL				
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
OK	Экстракция РНК/ДНК	< 31	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 25	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
Для соответствующей ПЦР-смеси-1-FL				
К+ <i>hRSv- hMpv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25
К+ <i>hAdv-hBov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 24	< 24
К+ <i>hRv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	-	< 24
К+ <i>hPiv1/3</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 26	< 26
К+ <i>hPiv2/4</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 26	< 26
К+ <i>hCov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 22	< 22

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/HEX** или/и **ROX** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 7).
- Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналам **JOE/HEX** или/и **ROX** для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу **FAM** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение во вкладыше к комплекту реагентов для приборов **iQ iCycler** и **iQ5 (Bio-Rad, США)** (см. табл. 7).
- Образец считается невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по всем каналам детекции возбудителей ОРВИ, и по каналу для **FAM** значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции РНК/ДНК.
- Образец считается сомнительным**, если в таблице результатов по каналам **JOE/HEX** или/и **ROX** для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 7). Образцы, для

Вариант FRT Форма1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,iQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 25.03.21 / стр. 16 из 27

которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу результат считается сомнительным.

Таблица 7

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

ПЦР-смесь-1-FL	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM	JOE/HEX	ROX
	Детекция ВКО	Детекция возбудителя	Детекция возбудителя
<i>hRSv-hMpv</i>	ВК<31	<i>hRSv</i> < 31	<i>hMpv</i> < 31
<i>hAdv-hBov</i>	ВК<31	<i>hBov</i> < 29	<i>hAdv</i> < 30
<i>hRv</i>	ВК<31	=	<i>hRv</i> < 30
<i>hPiv 1/3</i>	ВК<31	<i>hPiv3</i> < 32	<i>hPiv1</i> < 30
<i>hPiv 2/4</i>	ВК<31	<i>hPiv2</i> < 30	<i>hPiv4</i> < 30
<i>hCov</i>	ВК<31	<i>NL-63, 229E</i> < 32	<i>HKU-1, OC43</i> < 30

Возможные ошибки

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для К+ значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение порогового цикла, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для ОК и/или К- по каналу детекции возбудителя определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК/ДНК данного возбудителя, 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 использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора

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 – ВКО STI-рес; Hex – специфика; Rox – специфика**.
5. Задать программу амплификации с применением команды **Создать новую программу/редактировать программу** (см. табл. 8 а,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 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	–	

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!** Необходимо следить 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 переворачивать 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 – 60 %**, **Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 5 %**, **верхняя граница/порог нормализации данных – 10 %**.

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 10–20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

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 РНК/ДНК (см. табл. 9). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в табл. 9 для прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).

Таблица 9

**Результаты анализа контрольных образцов для прибора «ДТ-96»
(«ДНК-Технология», Россия)**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		Fam	Hex	Rox
		Пороговое значение для детекции ВКО	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя
Для всех ПЦР-смесей-1-FL				
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
OK	Экстракция НК	< 30	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 23	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
Для соответствующей ПЦР-смеси-1-FL				
К+ <i>hRSv-hMpv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 24	< 25
К+ <i>hAdv-hBov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 21	< 24
К+ <i>hRv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	-	< 22
К+ <i>hPiv1/3</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 26	< 24
К+ <i>hPiv2/4</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 26	< 24
К+ <i>hCov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 23	< 21

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналу **Hex** или/и **Rox** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 10).
- Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналу **Hex** или/и **Rox** для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу **Fam** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение во вкладыше к комплекту реагентов для прибора «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия) (см. табл. 10).
- Образец считается невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по всем каналам детекции возбудителей ОРВИ, и по каналу для **Fam** значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции РНК/ДНК.
- Образец считается сомнительным**, если в таблице результатов по каналу **Hex** или/и **Rox** для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 10). Образцы, для которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу результат считается сомнительным.

Таблица 10

Интерпретация результатов в исследуемых образцах для прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия)

ПЦР-смесь-1-FL	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	Fam	Hex	Rox
	Детекция ВКО STI-rec	Детекция возбудителя	Детекция возбудителя
<i>hRSv-hMpv</i>	< 30	<i>hRSv</i> < 30	<i>hMpv</i> < 30
<i>hAdv-hBov</i>	< 30	<i>hBov</i> < 30	<i>hAdv</i> < 30
<i>hRv</i>	< 30	–	<i>hRv</i> < 28
<i>hPiv 1/3</i>	< 30	<i>hPiv3</i> < 31	<i>hPiv1</i> < 28
<i>hPiv 2/4</i>	< 30	<i>hPiv2</i> < 30	<i>hPiv4</i> < 28
<i>hCov</i>	< 30	<i>NL-63, 229E</i> < 31	<i>HKU-1, OC43</i> < 31

Возможные ошибки

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для К+ значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение порогового цикла, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для ОК и/или К- по каналу детекции возбудителя определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК/ДНК данного возбудителя, 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 или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, 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. 11а, 11б). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

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, HEX, ROX	
	72	25 с	–	

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

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, 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**.

- Сохранить протокол, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, 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.

- 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, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

- 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.

- 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**.

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.

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 уровне 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного и положительного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных образцов (см. табл. 12).

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

Таблица 12

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM	HEX	ROX
		Пороговое значение для детекции ВКО STI-rec	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя
Для всех ПЦР-смесей-1-FL				
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
OK	Экстракция РНК/ДНК	< 31	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	< 25	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
Для соответствующей ПЦР-смеси-1-FL				
К+ <i>hRSv-hMpv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 25	< 25
К+ <i>hAdv-hBov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 24	< 24
К+ <i>hRv</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	-	< 24
К+ <i>hPiv1/3</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 26	< 26
К+ <i>hPiv2/4</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 26	< 26
К+ <i>hCov</i>	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 22	< 22

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналам **HEX** или/и **ROX** для него определено значение порогового цикла «Ct», не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 13).
- Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналам **HEX** или/и **ROX** для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу **FAM** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 13).
- Образец считается невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по всем каналам детекции возбудителей ОРВИ, и по каналу для **FAM** значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции РНК/ДНК.
- Образец считается сомнительным**, если в таблице результатов по каналам **HEX** или/и **ROX** для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 13). Образцы, для

которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу результат считается сомнительным.

Таблица 13

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

ПЦР-смесь-1-FL	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM	HEX	ROX
	Детекция ВКО	Детекция возбудителя	Детекция возбудителя
<i>hRSv-hMpv</i>	ВК<31	<i>hRSv</i> < 31	<i>hMpv</i> < 31
<i>hAdv-hBov</i>	ВК<31	<i>hBov</i> < 29	<i>hAdv</i> < 30
<i>hRv</i>	ВК<31	=	<i>hRv</i> < 30
<i>hPiv 1/3</i>	ВК<31	<i>hPiv3</i> < 32	<i>hPiv1</i> < 30
<i>hPiv 2/4</i>	ВК<31	<i>hPiv2</i> < 30	<i>hPiv4</i> < 30
<i>hCov</i>	ВК<31	<i>NL-63, 229E</i> < 32	<i>HKU-1, OC43</i> < 30

Возможные ошибки

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для К+ значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение порогового цикла, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
Если для ОК и/или К- по каналу детекции возбудителя определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК/ДНК данного возбудителя, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.