

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus 2* генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Rotavirus / Norovirus /*

***Astrovirus-FL*»**

Вариант FEP/FRT

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА 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)	7
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	13
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10...	16
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 И ВЫШЕ	19
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «Джин» и «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 3.3 и ВЫШЕ (ДО ВЕРСИИ 4.4)	22
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ (формат FRT)	25

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus 2* генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-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 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 названий флуорофоров и каналов детекции (формат FRT)

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

а также совместно с детекторами конечной флуоресценции:

- трехканальными и четырехканальными детекторами ALA-1/4 (SIA Biosan, Латвия),
- двухканальным и четырехканальным детектором «Джин» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции (формат FEP)

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
канал для флуорофора FAM	FAM/Специфика
канал для флуорофора JOE	HEX/ВК

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При работе с приборами Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или пробирок на 0,1 мл.

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Установить пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene 3000/6000 (ячейки карусели пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе). Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой. При одновременной загрузке в ротор пробирок с несколькими типами реакционных смесей в первую ячейку должна быть помещена пробирка с ОТ-ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Rotavirus/Astrovirus*.

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. Выбрать объем реакционной смеси и тип ротора:

Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл

Rotor type – 36-Well Rotor/36-луночный ротор или ***72-Well Rotor/72-луночный ротор*** в зависимости от используемого ротора.

5. Задать программу амплификации, для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.

Программа амплификации для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

6. Задать параметры калибрования (*активировать **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн. в мастере нового эксперимента***):

- осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (*активировать **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых***);
- осуществлять калибрование по каналам FAM/Green, JOE/Yellow перед первым измерением (*активировать **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции***);
- установить калибровки канала FAM/Green по первой пробирке и от **5 FI до 10 FI**, канала JOE/Yellow – от **5 FI до 10 FI** (*активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала***).

7. Запустить программу амплификации, активировав **Start Run/Старт**, и присвоить название эксперименту.

8. В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение исследуемых образцов и отрицательного контроля выделения, положительного и отрицательного контролей прохождения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК.

Для этого необходимо внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Положительный контроль ОТ-ПЦР обозначить как «K+», отрицательный – как «K-». Напротив всех исследуемых образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контролей – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля выделения – тип **Negative control/Отрицательный контроль**, отрицательного контроля ОТ-ПЦР – тип **NTC/ОТР. (ПФ)**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

Анализ результатов:

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** и **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (FAM/Green и JOE/Yellow) **Threshold/Порог**.
3. В меню каждого основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05** и установить значение **More settings/Устранение выбросов – 5 – 10%** (для канала **FAM/Green**) и **10%** (для канала **JOE/Yellow**).
5. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.
6. Значения **Ct** для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов В–, К+ *Rotavirus/ Astrovirus*, К+ *Norovirus 2* генотип /ST1, К– в соответствии с пороговыми значениями **Ct**, указанными во вкладыше к набору реагентов.
7. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят отдельно для каждого типа ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT в соответствии с пороговыми значениями **Ct**, указанными во вкладыше к набору реагентов.

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 АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler 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:

1. Включить прибор и оптический модуль за 20-30 мин до проведения реакции.
2. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
3. Задать программу амплификации (**Protocol**).

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE/HEX (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

Дать название новому протоколу и сохранить его.

4. Задать расположение проб на платформе (**Plate**), выбрать каналы для флуорофоров FAM и JOE/HEX (**Select/add fluorophores**), активировать флуорофоры для проб в созданном протоколе с помощью **клавиши Fluorophore loading in Whole Plate mode**, выбрать **Sample Volume – 25** мкл, **Seal Type – Domed Cap**, **Vessel Type – Tubes**, затем сохранить созданный протокол **Save/Exit Plate Editing**.
5. После этого установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
6. Запустить прибор (**Run**), выбрать **Run Persistent Plate** и сохранить эксперимент.

Анализ результатов:

1. Анализ результатов проводится по каналам для флуорофоров FAM и JOE/HEX.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Data Analysis**.
3. Выбрать **Base line** в **Crossing Threshold User Defined** в диапазоне **20 – 25**. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать кривые другой формы. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
4. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов В–, К+ *Rotavirus/ Astrovirus*, К+ *Norovirus 2* генотип /ST1, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
5. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

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 (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу **RealTime_PCR**. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – **ОКИ** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип – качественный**
 - **Метод – Пороговый (Ct)**
 - **Пробирки – образец**
 - Контроли: **нет**.
 - Объем рабочей смеси в пробирке – **25 мкл**
 - Флуорофоры: **Fam – специфика; Hex (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать R6G) – специфика**.
 - Задать программу амплификации и нажать **ОК**.

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров Fam и Hex (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **ОК1**, указать количество образцов и нажать **ОК**.
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.
6. Выбрать закладку **Запуск программы амплификации**, проверить параметры теста. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте стрипы/плашку при установке в прибор.
7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Мультиплекс**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и задать параметры:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**;
 - Величина **Threshold – 10 StD** на участке линейного фитирования;
 - Критерии достоверности результатов: **нижняя граница/порог положительного результата – 10 % F (Cp), верхняя граница/порог нормализации данных – 30% F (Cp)**.
 - **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует). Нажать кнопку **Применить**.
 - Включить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Ф** (нажать кнопку).
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
6. Значения **Ct** для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения

контрольных образцов В–, К+ *Rotavirus/Astrovirus*, К+ *Norovirus 2* генотип /ST1, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

7. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

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, 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.

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor - New** задать параметры амплификации (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и HEX (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

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

4. 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.

5. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**. Нажав на кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками флуорофоры FAM и HEX, нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.
Примечание – при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.
6. Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, и задать имя файла. Выбрав или отредактировав нужную схему планшета, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.
7. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Из вкладки **Start Run** запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**. Сохранить эксперимент.
8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов).

1. Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.
2. Поочередно для каждого канала установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции K+ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.
3. При нажатии кнопки панели инструментов **View/Edit Plate...** откроется окно, в котором можно дать название или переименовать образцы.
4. Значения C_t для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов ОК, K+, K– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

5. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения C_t , не превышающие значения порогового цикла, указанного во вкладыше, считаются положительными.

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

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10

Установка параметров теста Rota/Astro

1. Запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста **Rota/Astro**, нажать кнопку **OK**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (FAM, HEX).
6. В полях «**п-**» и «**п+**» установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической кДНК (см. вкладыш к набору реагентов).
7. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:
Rotavirus = FAM;
Astrovirus = HEX.
8. В поле **Доверительный интервал** установить значение **555 %**.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

Установка параметров теста Noro/ВКО

1. Запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста **Noro/ВКО**, нажать кнопку **OK**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (**FAM, HEX**), в группе **ВКО** отметить канал, который используется для внутреннего контроля (**FAM**).
6. В полях «**п-**» и «**п+**» установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каналу для детекции специфической кДНК (см. вкладыш к набору реагентов).
7. В поле **ВКО/фон** задать пороговое значение отношения сигнала по каналу для детекции **ВКО** к фону (см. вкладыш к набору реагентов).

8. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:

Norovirus = **HEX**.

9. В поле **Доверительный интервал** установить значение **555 %**.
10. Нажать кнопку **Сохранить**.

Измерение флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Для этого в главном меню выбрать **Протокол** → **Создать новый** или **Открыть**, чтобы открыть созданный ранее протокол.
3. В окне протокола необходимо выбрать тип используемого ротора (**36 x 0,5** или **48 x 0,2**), ввести номер протокола, выбрать нужный тест (**Rota/Astro**, **Noro/ВКО**) в меню-вкладке **Тест** и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
4. Обозначить образцы, которые являются фоновыми для данной группы образцов, как **«ФОН»** (используя сочетание клавиш **Ctrl** и **F**). В качестве образцов, обозначенных **«ФОН»** использовать пробирки с образцами **«ФОН»**.
5. Закрыть окно редактирования протокола, нажав на кнопку **Exit** в верхнем левом углу панели. Протокол сохранить.
6. Поставить пробирки в ячейки ротора в соответствии с заданной последовательностью и запустить детекцию, выбрав в меню **Протокол** → **Детекция** или значок **Детекция по протоколу** на панели инструментов (вверху экрана). По окончании измерения на экран будет выведена таблица результатов.

В. Интерпретация результатов

1. Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы **ALA_1**. Результаты в таблице представляются с помощью следующих обозначений:

«обнаружено» – положительный результат;

«не обнаружено» – отрицательный результат;

«сомнительно» – результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает

пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»);

«нд» – недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).

2. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК.
3. Результаты постановки контролей для теста **Noro/ВКО** представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-исследования для теста «Noro/ВКО»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации	
		Канал FAM	Канал HEX
В–	Экстракция РНК	ВКО+	«не обнаружено»
К–	ПЦР	ВКО–	«нд»
К+ <i>Norovirus 2</i> генотип /ST1	ПЦР	ВКО+	«обнаружено»

4. Результаты постановки контролей для теста Rota/Astro представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-исследования для теста «Rota/Astro»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации	
		Канал FAM	Канал HEX
В–	Экстракция РНК	«не обнаружено»	«не обнаружено»
К–	ПЦР	«не обнаружено»	«не обнаружено»
К+ <i>Rotavirus/ Astrovirus</i>	ПЦР	«обнаружено»	«обнаружено»

5. Оценка результатов анализа проводится только для тех образцов, которые в тесте «Noro/ВКО» по каналу FAM имеют результат «ВКО+» в соответствии с табл. 1.
6. Образцы, для которых получен результат «нд» (кроме К–), требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции РНК из исследуемого материала. Для образца К– результат «нд» является нормой.
7. Образцы, для которых получен результат «сомнительно», требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 И ВЫШЕ



1. Включить прибор и запустить программу **ALA_1** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Тест для обнаружения **Rotavirus A**, **Norovirus** и **Astrovirus** может быть предустановлен в программе **ALA_1**.
3. Проверить наличие теста **Rota-Noro-Astro** в списке настроенных тестов можно, выбрав в основном меню программы **Настройки** → **Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** в таблице **Список тестов** найти тест **Rota-Noro-Astro**.
4. Если тест **Rota-Noro-Astro** не был предустановлен в программе **ALA_1**, то для проведения детекции и интерпретации результатов необходимо создать новый тест или импортировать его через архивный файл в список тестов, используемых на программе **ALA_1**.

ВНИМАНИЕ! Импорт или создание новых тестов в программе **ALA_1** возможно только для пользователей с правами администратора.

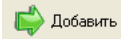


Импортировать новый тест.

Импорт новых тестов в программе **ALA_1** осуществляется через выбор основного меню **Настройки** → **Импорт тестов**. Далее выбрать архивный файл в формате *.zip и импортировать его в программу.




Создать новый тест.

- Выбрать в основном меню программы **Настройки** → **Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** добавить название нового теста **Rota-Noro-Astro** кнопкой  **Добавить** в таблице **Список тестов**.
- В поле **Реакционная смесь** задать название реакционных смесей: **Norovirus /STI, Rotavirus/Astrovirus**.
- Для реакционной смеси **Norovirus /STI** в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: **FAM** и **HEX**. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал **FAM** и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу - **ВКО**, установить значение порога - **3.0**. Далее для канала **HEX** задать обозначения по этому каналу **Norovirus**, в поле порога для **+** и **-**


установить **3,0** и **2,5** соответственно. В поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.


- Для реакционной смеси **Rotavirus/Astrovirus** в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: **FAM** и **HEX**. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал **FAM** и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу – **Rotavirus**, в поле пороги для + и – установить **3,0** и **2,5** соответственно. Далее для канала **HEX** задать обозначения по этому каналу **Astrovirus**, в поле пороги для + и – задать **3,0** и **2,5** соответственно. В поле **ведите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.
- Отметить контроли, использующиеся в этом тесте: **ОКО** (отрицательный контроль выделения), **К+** (положительный контроль амплификации), **К–** (отрицательный контроль амплификации). Выбрать алгоритмы интерпретации для контролей по умолчанию.
- В поле **Таблица интерпретации результатов** нажать кнопку  **Создать**. Программой **ALA_1** будет автоматически создана таблица возможных вариантов сочетаний результатов детекции для всех реакционных смесей для всех каналов и итоговый результат для каждого из этих вариантов. Продолжением этой таблицы являются возможные варианты сочетаний результатов контролей. Результаты детекции клинических образцов и контролей будут выдаваться после измерения в соответствии с этой таблицей. Сохранение теста и закрытие окна осуществляется кнопкой  **OK**.

5. Создать протокол измерения.

- В основном окне программы нажать кнопку  **Новый протокол**. В появившемся окне **Окно настройки протокола** выбрать тест **Rota-Noro-Astro** из списка доступных тестов и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный тест появится в списке **Тесты протокола**.
- В поле **Количество образцов** задать количество исследуемых образцов без контрольных образцов и образцов **«ФОН»**, нажать кнопку  **Добавить**. В поле **Количество фоновых пробирок** выбрать их необходимое количество для каждой реакционной смеси.
- В **Таблице имен образцов, фоновых пробирок и контролей** задать имена образцов, добавить необходимое количество контролей. В поле **Тип ротора**

выбрать ротор, который будет использоваться в данном протоколе.

Сохранение протокола и закрытие окна осуществляется кнопкой  **OK**.

6. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора **ALA-1/4** в соответствии с заданной последовательностью. Запустить измерение, нажав на кнопку  **Измерить** в панели активных кнопок (вверху экрана).

Интерпретация результатов

1. Результат измерения выдается программой после завершения измерения протокола в окне **Окно результатов**. Полученные данные интерпретируются программой автоматически в соответствии с **Таблицей интерпретации результатов**:
 - **«обнаружено» (Norovirus)** указывается для образцов, в которых обнаружена РНК *Norovirus 2 генотипа*, аналогично для *Rotavirus A*, *Astrovirus*;
 - **«не обнаружено»** указывается для образцов, в которых не обнаружена РНК *Norovirus 2 генотипа*, *Rotavirus A*, *Astrovirus*;
 - **«невалидный»** указывается для образцов, у которых не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа экстракции ДНК из исследуемого материала;
 - **«сомнительный»** указывается для образцов, у которых сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа экстракции ДНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.
2. Интерпретацию результатов проведенного тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
3. Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными только в случае получения удовлетворительных результатов прохождения контрольных образцов В–, К+, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «Джин» и «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 3.3 и ВЫШЕ (ДО ВЕРСИИ 4.4)

Детекция проводится согласно описанию в паспорте «Детектор полимеразной цепной реакции флуоресцентный Джин».

Для детекции и интерпретации результатов используются настройки, указанные во вкладыше к набору реагентов.

Настройка тестов

Для детекции и интерпретации результатов используются следующие настройки для тестов:

Noro/ВКО:

- Наименование теста - **Noro/ВКО**
- Специфика по каналу для флуорофора **Hex (ПО 4.4I) / ВК (ПО 3.3I)**, внутренний контроль по каналу для флуорофора **Fam (ПО 4.4I) / Специфика (ПО 3.3I)**.
- Пороговые значения для канала **Fam/Специфика** должны составлять **3,0**; для канала **Hex/ВК** - «п–» = **2,5** и «п+» = **3,0**.

Rota/Astro:

- Наименование теста - **Rota/Astro**
- Специфика по каналам для флуорофоров **Hex (ПО 4.4I) / ВК (ПО 3.3I)**, **Fam (ПО 4.4I) / Специфика (ПО 3.3I)**.
- Пороговые значения для каналов **Fam/Специфика** и **Hex/ВК** должны составлять «п–» = **2,5** и «п+» = **3,0**.

Настройки теста можно установить, выбрав меню *Настройки, Список тестов* в главном меню программы, и, если значения изменены, требуется восстановить начальные значения, указанные выше.

1. Включить прибор и запустить программу **Gene** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Ввести количество измеряемых образцов и количество фоновых пробирок (**2** на каждый тест), выбрать нужный тест (**Rota/Astro, Noro/ВКО**) в графе **Тест**, нажать кнопку **ОК** (кнопкой мыши) и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
3. В качестве образцов, обозначенных «**ФОН**» использовать пробирки с образцами «**ФОН**».
4. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «**Джин**» в соответствии с заданной последовательностью (сначала первые 12 образцов) и запустить детекцию,

нажав кнопку, обозначенную значком цветной призмы, в панели активных кнопок (вверху экрана). По окончании детекции первой группы заменить пробирки следующей группой пробирок и продолжить измерения, нажав кнопку **OK**. По окончании детекции вынуть пробирки и нажать кнопку **OK**.

Интерпретация результатов

1. Результаты автоматической интерпретации ПЦР-детектора «Джин» (2-х канального) **не используются**. Анализ полученных результатов проводить согласно инструкции, вкладышу и табл. 3.

Таблица 3

Оценка результатов анализа

Тестируемые пробирки	Результат автоматической интерпретации	Результат по уровню флуоресценции		Результат
		Канал «специфика»	Канал «ВК»	
OT-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus/Astrovirus</i>	+	+	-	В пробе выявлена РНК <i>Rotavirus A</i>
	-	-	+	В пробе выявлена РНК <i>Astrovirus</i>
	«нд»	-	-	В пробе не выявлена РНК <i>Rotavirus A</i> и РНК <i>Astrovirus</i>
	+	+	+	В пробе выявлена РНК <i>Rotavirus A</i> и РНК <i>Astrovirus</i>
OT-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus / STI</i>	+	+	-	В пробе не выявлена РНК <i>Norovirus 2</i> генотип
	-	-	+	В пробе выявлена РНК <i>Norovirus 2</i> генотип
	«нд»	-	-	Проба требует повторного перевыделения и тестирования на всех смесях
	+	+	+	В пробе выявлена РНК <i>Norovirus 2</i> генотип

2. Для «Джин-4» (4-х канального) полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы Gene (колонка **Результат** на экране)

- знаком **+** (на красном фоне) обозначаются положительные образцы;
- знаком **-** (на зеленом фоне) – отрицательные образцы;
- знаком **?** (на желтом фоне) обозначается сомнительный результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»)). Для таких

- образцов требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа экстракции ДНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными;
- **«нд»** (на оранжевом фоне) обозначается недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).
3. Интерпретация результатов проведенного тестирования исследуемых образцов проводится в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов
 4. Результаты ПЦР-исследования считаются достоверным, если получены правильные результаты прохождения контрольных образцов В–, К+, К– в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. в инструкции и вкладыш к набору реагентов).
 5. Образцы, для которых получен результат **«нд»** (кроме К–), требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции ДНК из исследуемого материала. Для образца К– результат **«нд»** является нормой.
 6. Если результаты контрольных образцов не соответствуют указанным значениям, требуется предпринять меры, указанные в инструкции к набору реагентов.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ (формат FRT)

Если для пробы в таблице результатов зафиксировано значение порогового цикла, но график флуоресценции по этому каналу не имеет правильной (S-образной) формы с участком характерного экспоненциального подъема флуоресценции (график представляет собой прямую линию), результат является ошибочным, его нельзя интерпретировать как положительный. Такой результат может свидетельствовать о неправильно установленном уровне пороговой линии (или других параметров анализа). Если результат получен при правильном уровне порога (и других параметрах), то для данного образца (образцов) результат является ошибочным, его интерпретируют как отрицательный.

Если для отрицательного контроля в таблице результатов зафиксировано значение порогового цикла, но график флуоресценции по этому каналу не имеет правильной (S-образной) формы с участком характерного экспоненциального подъема флуоресценции (в частности, если график представляет собой прямую линию), результат является ошибочным, его интерпретируют как отрицательный