

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления, дифференциации и количественного

определения ДНК вируса папилломы человека

в биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL»

Формат FRT

АмплиСенс®



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

RUO

Только для исследовательских и иных
немедицинских целей

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	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)	6
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США)	21
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	25
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)	29
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРОГРАММЫ FRT Manager	34
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	39

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления, дифференциации и количественного определения ДНК вируса папилломы человека в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).









Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹⁾
Канал для флуорофора FAM	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
Канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! В соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008 и ГОСТ 31340-2013 следующие реагенты подлежат маркировке как содержащие опасные вещества:

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

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 ¹			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м3	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Лизирующий раствор	 <p>Предупреждение (Warning)</p>	 <p>Предупреждение (Warning)</p>	Гуанидин хлорид	Нет данных			
			Трилон X-100	Нет данных			
Отмывочный раствор	  <p>Предупреждение (Warning)</p>	  <p>Предупреждение (Warning)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Сорбент универсальный	 <p>Предупреждение (Warning)</p>	 <p>Предупреждение (Warning)</p>	Селите®	Нет данных			

ВНИМАНИЕ! При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать

¹ Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ 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 6 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/Q/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование пробирок для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки в ротор амплификатора так, чтобы первая пробирка (с **ПЦР-смесью-FL ВПЧ 16,18,31 / Glob**) первого стрипа попала в лунку 1 или лунку A1 (в зависимости от типа ротора), далее последовательно установить пробирки по принципу «голова-хвост» так, чтобы первая пробирка следующего стрипа следовала за последней пробиркой предыдущего. Другими словами, первая пробирка стрипа должна всегда оказываться в лунках с номером 1, 5, 9, 13 и т.д. (или A1, A5, B1, B5, C1 и т.д.). Надеть фиксирующее кольцо, установить ротор в прибор, закрыть крышку.

ВНИМАНИЕ! Не переворачивать стрипы при установке в ротор.

ВНИМАНИЕ! При установке в ротор не оставлять пропусков между стрипами.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы или на панели инструментов для открытия диалогового окна **New Run/Новый тест**.

Примечание – Окно **New/Новый** может запускаться автоматически при запуске программы.

4. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента

Advanced/Детальный мастер и выделить **Empty Run/Пустой шаблон**.
Нажать кнопку **New/Новый**.

Примечание – Для использования настроек предыдущего эксперимента можно выбрать пункт **Perform Last Run/Как предыдущий тест**.

5. В открывшемся окне выбрать ротор на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор** и поставить отметку в пункте **Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
Нажать кнопку **Next/Далее**.
6. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси:
Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл. Нажать кнопку **Next/Далее**.
7. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента.
Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать параметры амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

8. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
9. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн**.
 - а) осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - б) установить калибровки каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red (нажать кнопку **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала**, указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал – 5, Max Reading/Максим. Сигнал – 10**);
 - в) осуществлять калибрование по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange

перед первым измерением (отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
11. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
12. В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо ввести положение пробирок в роторе. Для этого использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна программы). Напротив всех образцов, включая контроли, установить тип **Unknown/Образец**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

Анализ результатов:

1. Удостоверьтесь, что все анализируемые образцы активны в легенде справа.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**; **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** и **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Cycling A. Cy5/Cycling A. Red, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red) **Threshold/Порог**.
4. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
5. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,03**.
7. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным 15 % по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и 10 % по каналу Cy5/Red.
8. В таблице результатов (окно **Quantitation Results**): выделить колонку **Name/Имя**,

однократно щелкнув мышью на заголовке. Скопировать колонку, выбрав **Сору/Копировать** из контекстного меню (вызывается правой кнопкой мыши) (см. рис. 9).

9. Открыть на диске, прилагающемся к набору реагентов, программное обеспечение «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр» в формате Microsoft® Excel для обработки данных и получения результатов, согласиться на включение макроса.

Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (кнопка **Выдать результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.

10. Установить курсор на ячейку **Имя** и выбрать **Paste/Вставить** из контекстного меню (см. рис. 10).

11. Аналогично выбрать и скопировать колонку **Ct** из таблицы результатов (**Quant. Results/Количественные результаты**). Установить курсор в таблице Excel в ячейку **Ct** под названием соответствующего канала детекции в колонке **Значение Ct** (см. рис. 9, 10).

12. Повторить процедуру для других каналов детекции.

13. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.

Примечание – Чтобы экспортировать (копировать) таблицу результатов анализа в Excel без искажения русского шрифта, необходимо переключить свою клавиатуру на русский шрифт перед тем, как нажать в меню **Экспорт в Excel** или **Копировать**.

14. Для корректной обработки данных программой необходимо в колонке **Имя** обозначить калибраторы как **K1 16-18-31; K1 39-45-59; K1 33-35-56-68; K1 51-52-58-66; K2 16-18-31; K2 39-45-59; K2 33-35-56-68; K2 51-52-58-66**, а отрицательные контроли как **OK**.

15. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Выдать результаты**. В колонке **Результат (выявленный генотип)** появятся выявленные в образцах типы ВПЧ.

Интерпретация результатов

Принципы, лежащие в основе автоматического анализа данных:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно

значения пороговых циклов, а так же их присутствие или отсутствие, анализируются программой автоматической интерпретации результатов.

ВНИМАНИЕ! В редких случаях возможно пересечение линии порога флуоресцентными кривыми, соответствующими отрицательным образцам. Однако выявить подобные случаи достаточно просто по виду кривых флуоресценции: см. раздел «Возможные проблемы и ошибки», а также рис. 7 и 8.

Эксперимент считается *валидным* если:

- в отрицательных контролях отсутствует *Ct* по всем каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red .
- В положительных контролях выявляются все 14 генотипов ВПЧ.

ВНИМАНИЕ! В случае невалидности эксперимента все полученные данные считаются недостоверными, требуется повтор эксперимента.

Результат выявления ДНК ВПЧ и генотипирования для данного образца считается:

- *невалидным*, если в одной из двух пробирок или в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) не зарегистрировано сигнала внутреннего контроля (канал Cy5/Red) или зарегистрирован только сигнал внутреннего контроля и расчетное значение менее 500 клеток (10^3 ГЭ ДНК человека/реакция).
- *отрицательным*, если в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) присутствует сигнал внутреннего контроля (канал Cy5/Red) и во всех четырех пробирках отсутствуют сигналы по другим каналам (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange), а в последних двух пробирках стрипа (3 и 4) отсутствует сигнал по всем четырем флуоресцентным каналам детекции.
- *положительным* – во всех остальных случаях.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

Перед использованием набора реагентов рекомендуется изучить этот раздел.

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Отрицательные образцы анализируются программой Rotor-Gene как положительные.	Неправильная математическая обработка отрицательных образцов при наличии участка падения флуоресценции на начальных циклах (рис. 2а, 8)	Типичный положительный образец имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции (рис. 1, 3 – 6). Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид довольно прямых линий, идущих снизу вверх (рис. 8)	Необходимо воспользоваться функцией Ignore First/Игнор. первые выбрав значение 5 циклов. Если это не приводит к должному результату попробуйте увеличить это значение на 1 – 5.
	Пересечение линией порога нисходящих кривых флуоресценции на начальных циклах (рис.7)	На графике обработанных кривых флуоресценции красная линия порога (Threshold/Порог) пересекает или «задевает» кривые флуоресценции в левой части графика (первые циклы) (рис. 7)	Воспользуйтесь функцией Eliminate cycles before.../Исключить циклы до... , задав значение 5, (игнорируется пересечение порога и кривой флуоресценции на первых 5 циклах)
Снижение чувствительности из-за загрязнения линз прибора	Загрязнение линз ведет к снижению эффективности возбуждения и регистрации флуоресценции, что в первую очередь сказывается на образцах с малым количеством специфичной ДНК, дающих малое увеличение флуоресценции	Низкие значения фонового сигнала по всем 4 каналам измерения флуоресценции (<1) при максимальном значении множителя gain (10)	Проводить очистку линз прибора не реже 1 раза в мес
Снижение чувствительности из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов набора (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в «грязных» условиях) могут приводить к разрушению олигонуклеотидов	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами <u>той же серии</u> . Выявляется по снижению значения автоматически выбираемого	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения)

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
		коэффициента умножения gain в разных экспериментах более чем на 2 единицы (<i>при использовании <u>одного и того же прибора</u></i>). ВНИМАНИЕ! Эффект увеличения множителя gain может также наблюдаться после очистки линз прибора от сильного загрязнения	
Снижение чувствительности из-за снижения активности полимеразы (TaqF)	Неправильное хранение полимеразы или внесение «грязи» приводит к разрушению фермента	Выявляется по непрохождению положительного контроля	Использовать адекватно хранящийся (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения) или новый фермент

Возможная ошибка	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых) (рис. 2б). Образец отрицательный	Повторное исследование образца
В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси или внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых) (рис. 2б)	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование
Не задан параметр автокалибровки от 5FI до 10FI или ошибка в первой пробирке барабана (ее отсутствие, неправильное внесение образца ДНК или реакционной смеси)	Большинство фоновых сигналов флуоресценции меньше 1 или больше 20	Задать параметр при следующем запуске. Если произошел «зашкал» или сигналы очень слабые (при обработке нет положительных сигналов, фон меньше 0,5) необходим повтор исследования.
При приготовлении смеси реагентов не внесена полимеразы (TaqF)	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Необработанные данные

Рисунок 1 – Нормальные исходные кривые

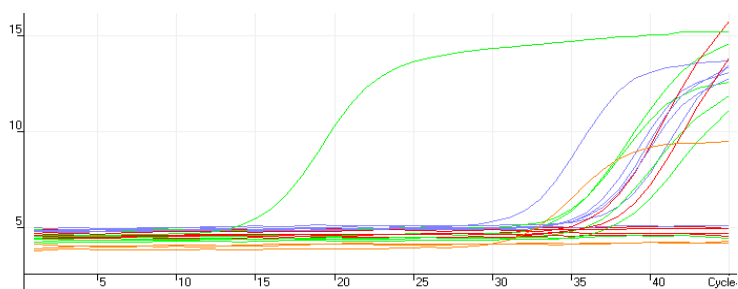


Рисунок 2а – Исходные кривые с «загибом» и низкий уровень фонового сигнала (диапазон 0,75-1,5) – *загрязненные линзы прибора*

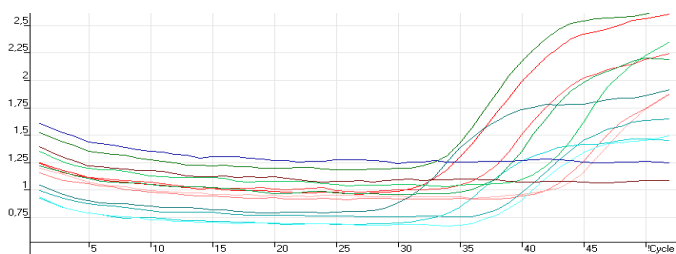
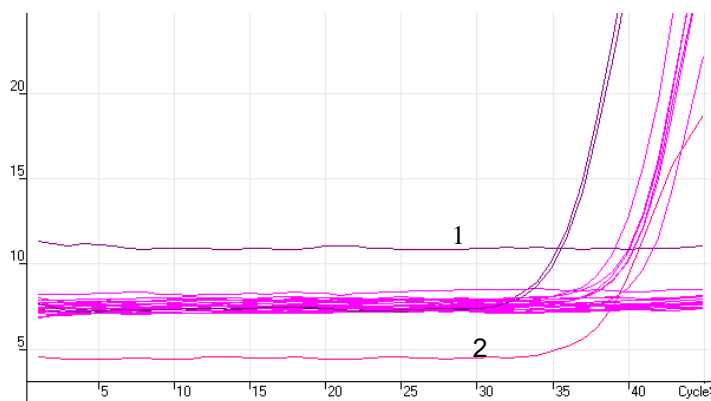


Рисунок 2б – Одна из возможных ошибок видна по уровню фонового сигнала: в пробирку **1** не был добавлен образец ДНК, в пробирку **2** попало двойное его количество.



Обработанные данные

а) нормальные кривые после обработки (типичный S-образный вид, линия порога пересекает кривые только в области накопления флуоресценции).

Рисунок 3 – Данные по каналу Cy5/Red – внутренний контроль (b-глобиновый ген)

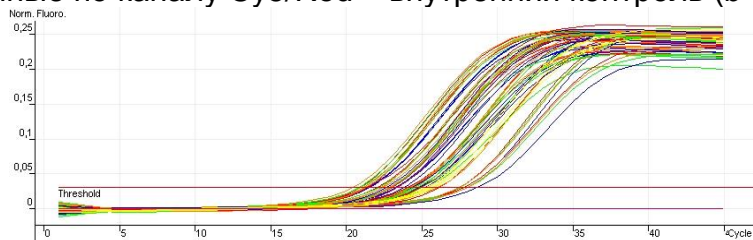


Рисунок 4 – Данные по каналу FAM/Green

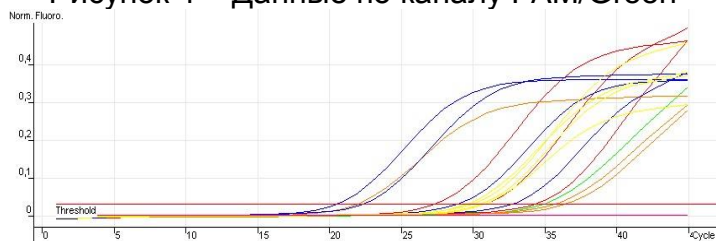


Рисунок 5 – Данные по каналу JOE/Yellow

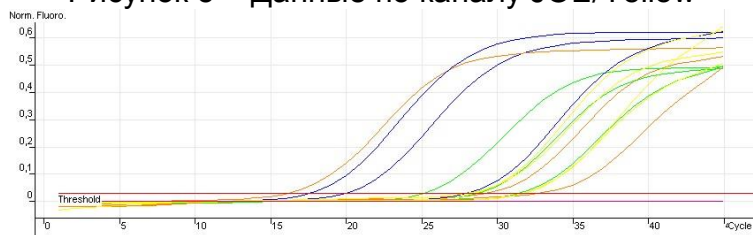
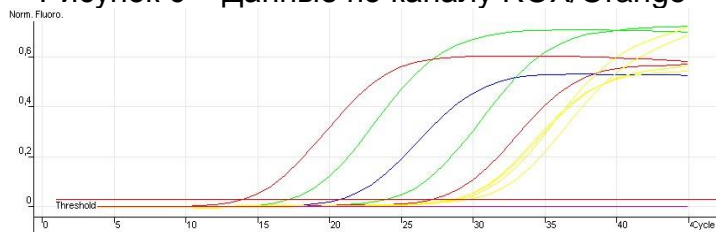


Рисунок 6 – Данные по каналу ROX/Orange



б) неправильная обработка кривых

Рисунок 7 – Линия порога пересекает кривые флуоресценции дважды

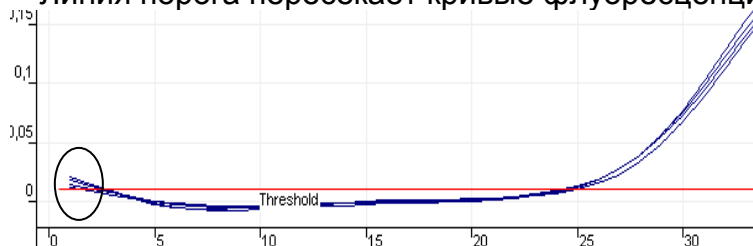
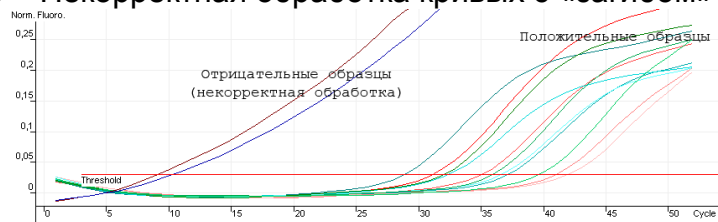


Рисунок 8 – Некорректная обработка кривых с «загибом» (из рис. 2)



Анализ результатов

Рисунок 9 – Таблица результатов **Quant.Results**

Name	Type	Ct	Given Conc (cop)	Cal
842t	Unknown	20,06		
	Unknown			
	Unknown	31,60		
	Unknown			
690kt	Unknown			
	Unknown	25,33		
	Unknown			
	Unknown	28,82		
+	Positive Control	28,66		
+	Positive Control	31,89		
+	Positive Control	31,86		
+	Positive Control	28,19		
-	Negative Control			
-	Negative Control			
-	Negative Control			
-	Negative Control			

Рисунок 10 – Программа для обработки результатов в формате Microsoft® Excel

Дата		Матрица сравнения				Значения Ct				Результат (выявленный генотип)	кол-во клеток	Ig ВПЧ 16,39,33,5 8/10 ⁵ клеток	Ig ВПЧ 31,45,35,5 2/10 ⁵ клеток	Ig ВПЧ 18,59,68,8 6/10 ⁵ клеток	Ig ВПЧ 56, 51/10 ⁵ клеток	СУММ Ig ВПЧ/10 ⁵ клеток	Клиническая значимость
№	Пункт	Имя	Fam	Hex	Rox	Суб	Fam	Hex	Rox								
	Well	Well Name					Ct	Ct	Ct	Ct							
	1	1	16	31	18	ЕК	20,0			17,0	31						
	2	1	39	45	59	ЕК	25,0			17,1	39	2,81	4,41			4,78	Значимый
	3	1	33	35	68	ЕК				19,0	68			4,53			
	4	1	58	52	66	ЕК											

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

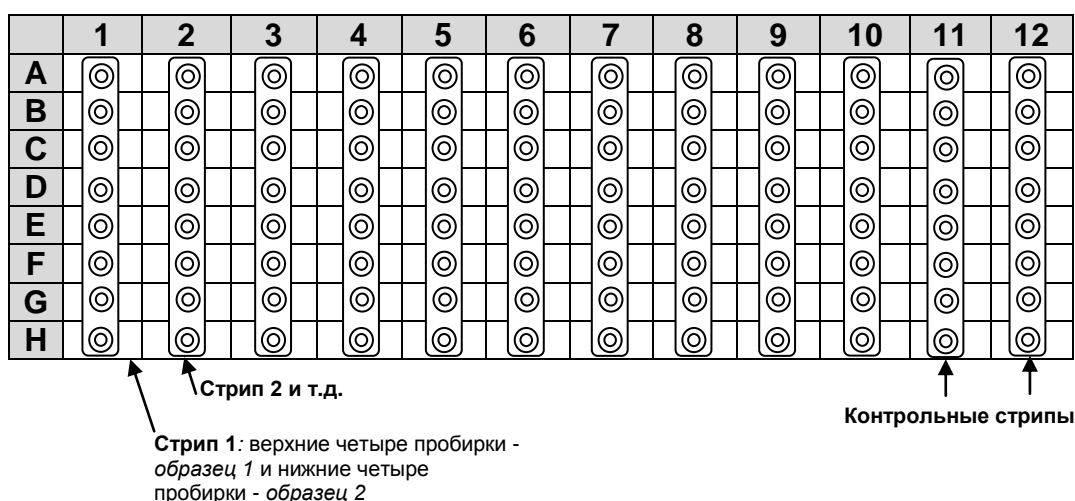
Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8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

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее 15 мин.

2. Открыть программу iCycler iQ5.

3. Установить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора строго согласно данной схеме планшки:



ВНИМАНИЕ! При установке не оставлять пропусков между стрипами (даже если количество стрипов меньше, чем изображено на рисунке), контрольный стрип устанавливать последним.

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

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение

флуоресцентного сигнала:

- 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 для варианта **FRT-100 F**, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes** или **Plate**. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**. Нажать **Сохранить**.
- 2. Все образцы, включая контроли, обозначить как **Unknown**.
- 3. Нажать **Cancel & Exit Plate Editing**
- 4. Задать программу амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

- в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. Ввести имя файла. Нажать **Сохранить**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- 5. Перед запуском выполнения программы:
 - **необходимо** 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**.
- 6. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения

прибора iCycler iQ5. 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, выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
2. Выбрать режим анализа данных **Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (установлен по умолчанию).
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно нажать кнопку **Log View** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер, и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K2 в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контрольного образца показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
4. Для анализа результатов нажать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

Открыть на диске, прилагающемся к набору реагентов, программное обеспечение «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр» в формате Microsoft® Excel для обработки данных и получения результатов, согласиться на включение макроса. Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Выдать результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.

1. Скопировать названия образцов из файла прибора в файл программы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр», скопировать значения пороговых циклов

для каждого канала из файла прибора в файл программы. Проверить значения, установленные в программе для калибраторов, они должны совпадать со значениями во вкладыше. Проверить правильность и дополнить подписи образцов. Для корректной обработки данных программой необходимо в колонке **Имя** обозначить калибраторы как **K1 16-18-31; K1 39-45-59; K1 33-35-56-68; K1 51-52-58-66; K2 16-18-31; K2 39-45-59; K2 33-35-56-68; K2 51-52-58-66**, а отрицательные контроли как **OK**.

2. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.
3. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Выдать результаты**. В колонке **Результат (выявленный генотип)** появятся выявленные в образцах типы ВПЧ.

Анализ данных.

Принципы, лежащие в основе автоматического анализа данных:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов, а так же их присутствие или отсутствие анализируются программой автоматической интерпретации результатов.

Эксперимент считается *валидным* если:

- в отрицательных контролях положительный сигнал отсутствует по всем каналам FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5.
- В положительном контроле выявляются все 14 типов ВПЧ и ДНК человека

ВНИМАНИЕ! В случае невалидности эксперимента все полученные данные считаются недостоверными, требуется повтор эксперимента.

Результат выявления ДНК ВПЧ и генотипирования для данного образца считается:

- *невалидным*, если в одной из двух пробирок или в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) не зарегистрировано сигнала внутреннего контроля (канал Cy5) или зарегистрирован только сигнал внутреннего контроля и расчетное значение менее 500 клеток (10^3 ГЭ ДНК человека/реакция)
- *отрицательным*, если в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) присутствует сигнал внутреннего контроля (канал Cy5) и во всех четырех пробирках отсутствуют сигналы по другим каналам (FAM, JOE/HEX, ROX), а в последних

двух пробирках стрипа (3 и 4) отсутствует сигнал по всем четырем флуоресцентным каналам детекции.

- *положительным* – во всех остальных случаях.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рисунок 11 – Данные по каналу FAM

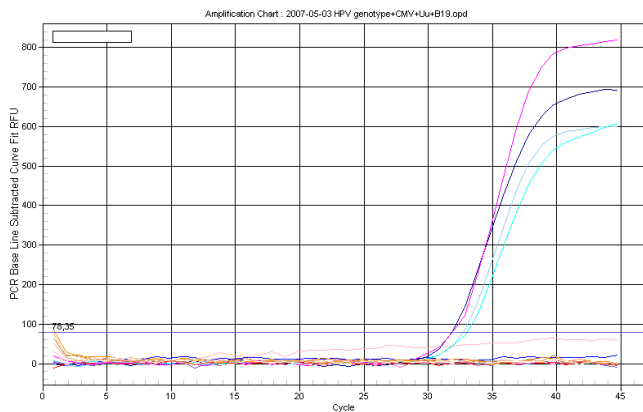


Рисунок 12 – Данные по каналу JOE/HEX

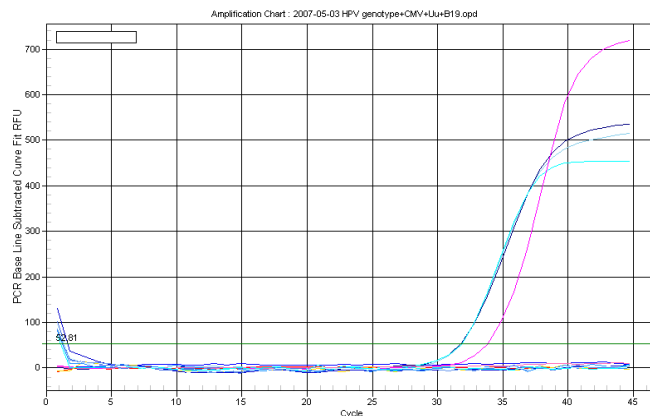


Рисунок 13 – Данные по каналу ROX

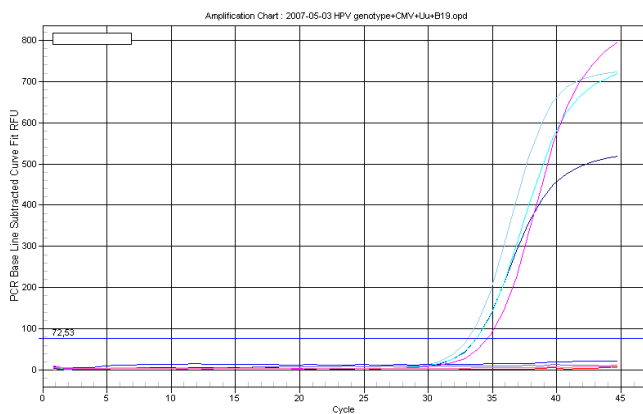
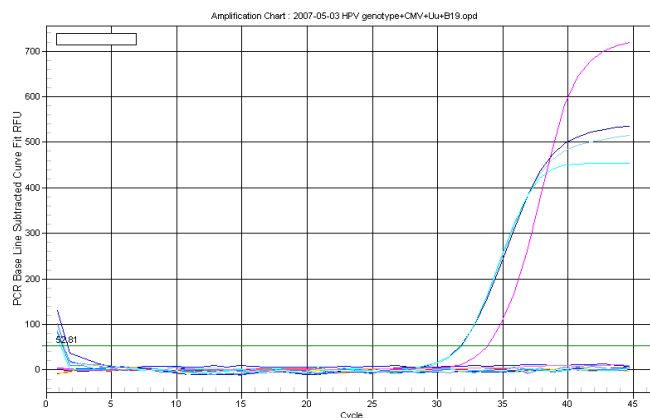


Рисунок 14 – Данные по каналу Cy5



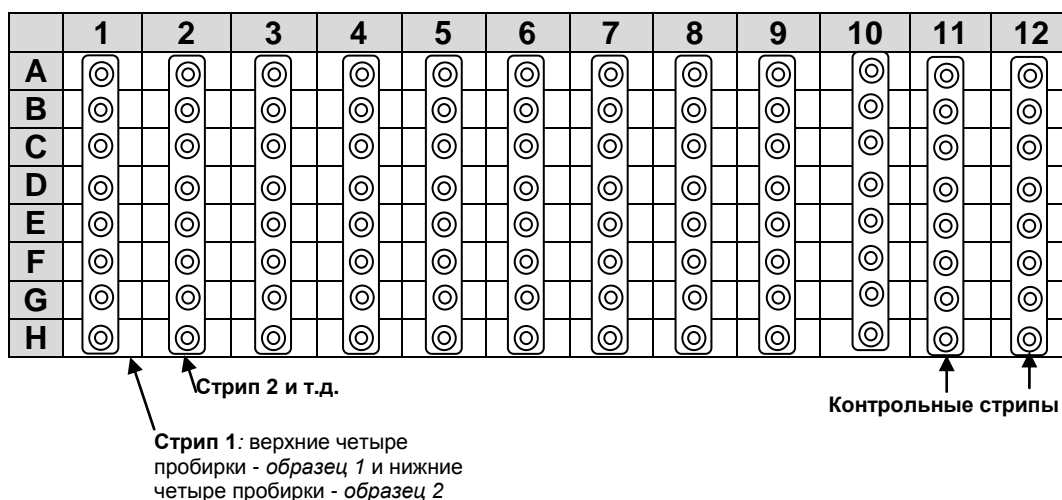
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США)

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, Axugen, США) (детекция через крышку пробирки).

1. Включить прибор, запустить программу Mx3000P/Mx3005P.
2. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее 15 мин.

3. Установить пробирки в прибор строго согласно данной схеме плашки, закрыть фиксатор и дверцу прибора.



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

ВНИМАНИЕ! При установке не оставляйте пропусков между стрипами (даже если количество стрипов меньше, чем изображено на рисунке), контрольные стрипы устанавливайте последними.

4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **HEX/JOE filter set** установить параметр JOE, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр FAM, напротив пункта **ROX**

filter set установить параметр ROX, напротив пункта **Cy5 filter set** установить параметр **Cy5**

5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - а) выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью);
 - б) обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить четыре флажка FAM, JOE, ROX и Cy5. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Information**). Внести подписи образцов также можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.
6. Во вкладке **Plate Setup** выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки. Перейти в меню **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data collection marker by dragging** и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.

7. Запустить амплификацию, нажав кнопку **Run**, затем **Start** и присвоив имя файлу эксперимента.

Анализ результатов

1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок). В противном случае выбрать все исследуемые образцы,

удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.

3. Перейти во вкладку **Results**.
 4. Убедиться, что четыре флуоресцентных канала активны (кнопки **Cy5**, **ROX**, **JOE/HEX**, **FAM** нажаты в поле **Assays Shown/Dyes Shown** внизу окна программы).
 5. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив всех четырех флуоресцентных каналов. Установите значения порогов:
 - Cy5 - 100
 - ROX - 200
 - JOE/HEX - 50
 - FAM – 300
 6. В поле **Area to analyze** выберите пункт **Text Report**. Визуально удостовериться, что все данные сортированы по имени лунки (колонка **Well**) по возрастанию. В противном случае однократно нажать на имя колонки **Well**.
 7. Открыть на диске, прилагающемся к набору реагентов, программное обеспечение «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр» в формате Microsoft® Excel для обработки данных и получения результатов, согласиться на включение макроса.
- Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Выдать результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.
8. Скопировать названия образцов из файла прибора в файл программы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр», скопировать значения пороговых циклов для каждого канала из файла прибора в файл программы. Проверить значения, установленные в программе для калибраторов, они должны совпадать со значениями во вкладке.
 9. Для корректной обработки данных программой необходимо в колонке **Имя** обозначить калибраторы как **K1 16-18-31; K1 39-45-59; K1 33-35-56-68; K1 51-52-58-66; K2 16-18-31; K2 39-45-59; K2 33-35-56-68; K2 51-52-58-66**, а отрицательные контроли как **OK**.
 10. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.
 11. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Выдать результаты**. В колонке **Результат (выявленный генотип)** появятся

выявленные в образцах типы ВПЧ.

Интерпретация результатов

Принципы, лежащие в основе автоматического анализа данных:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов, а так же их присутствие или отсутствие анализируются программой автоматической интерпретации результатов.

Эксперимент считается *валидным* если:

- в отрицательных контролях положительный сигнал отсутствует по всем каналам FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5 .
- В положительном контроле выявляются все 14 типов ВПЧ.

ВНИМАНИЕ! В случае невалидности эксперимента все полученные данные считаются недостоверными, требуется повтор эксперимента.

Результат выявления ДНК ВПЧ и генотипирования для данного образца считается:

- *невалидным*, если в одной из двух пробирок или в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) не зарегистрировано сигнала внутреннего контроля (канал Cy5) или зарегистрирован только сигнал внутреннего контроля и расчетное значение менее 500 клеток (10^3 ГЭ ДНК человека/реакция).
- *отрицательным*, если в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) присутствует сигнал внутреннего контроля (канал Cy5) и во всех четырех пробирках отсутствуют сигналы по другим каналам (FAM, JOE/HEX, ROX), а в последних двух пробирках стрипа (3 и 4) отсутствует сигнал по всем четырем флуоресцентным каналам детекции.
- *положительным* – во всех остальных случаях.

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

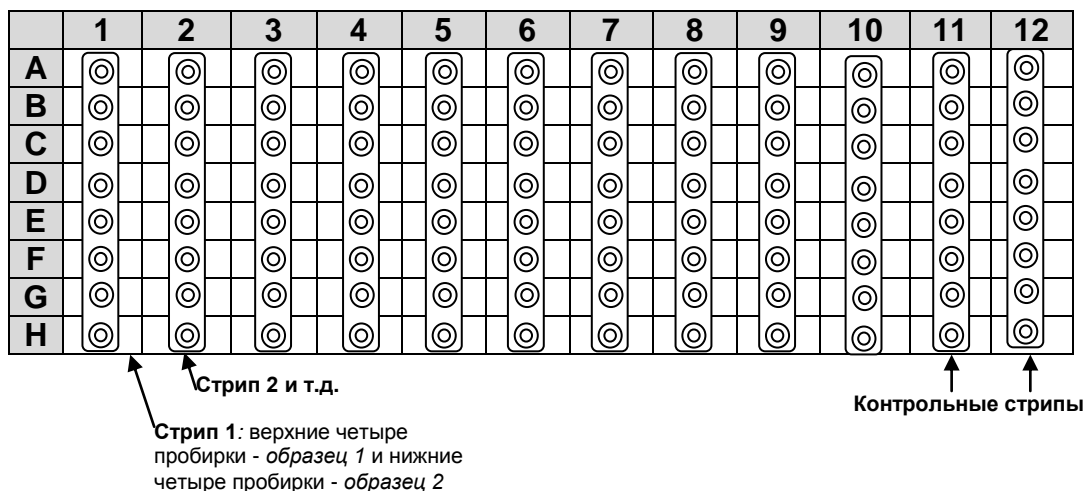
1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – **ВПЧ генотип** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – Пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль – ;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл
 - **Флуорофоры** – Fam, Hex, Rox –специфика, Cy5– ВКО.
5. Задать программу амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	Fam, Hex, Rox, Cy5	
	72	15 с	–	

6. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **ВПЧ генотип-FL**, указать количество образцов и нажать **ОК**
7. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.

8. 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! При установке не оставляйте пропусков между стрипами (даже если количество стрипов меньше, чем изображено на рисунке), контрольные стрипы устанавливайте последними.

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

9. Последовательно нажать кнопки **Закрывать блок** и **Запуск программы**.
Сохранить эксперимент.

Анализ результатов

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

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: $C_t(C_p)$ для всех каналов (Мультиплекс для версии программы v.7.5. и выше)**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (C_t)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,

- **Величина Threshold– 10 StD на участке линейного фитирования.**

Нажать кнопку **Применить**.

5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер, и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K2 в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контрольного образца показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
6. Открыть на диске, прилагающемся к набору реагентов, программное обеспечение «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр» в формате Microsoft® Excel для обработки данных и получения результатов, согласиться на включение макроса.

Примечание – Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Выдать результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выберите в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установите средний уровень безопасности.

1. Скопировать названия образцов из файла прибора в файл программы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр», скопировать значения пороговых циклов для каждого канала из файла прибора в файл программы. Проверить значения, установленные в программе для калибраторов, они должны совпадать со значениями во вкладыше. Проверить правильность и дополнить подписи образцов. Для корректной обработки данных программой необходимо в колонке **Имя** обозначить калибраторы как **K1 16-18-31; K1 39-45-59; K1 33-35-56-68; K1 51-52-58-66; K2 16-18-31; K2 39-45-59; K2 33-35-56-68; K2 51-52-58-66**, а отрицательные контроли как **OK**.
2. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.
3. После внесения всех данных в матрицу данных Excel нажать кнопку **Выдать**

результаты. В колонке **Результат (выявленный генотип)** появятся выявленные в образцах типы ВПЧ.

Интерпретация результатов

Принципы, лежащие в основе автоматического анализа данных:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов, а так же их присутствие или отсутствие анализируются программой автоматической интерпретации результатов.

Эксперимент считается *валидным* если:

- в отрицательных контролях положительный сигнал отсутствует по всем каналам Fam, Hex, Rox, Cy5.
- В положительном контроле выявляются все 14 типов ВПЧ.

ВНИМАНИЕ! В случае невалидности эксперимента все полученные данные считаются недостоверными, требуется повтор эксперимента.

Результат выявления ДНК ВПЧ и генотипирования для данного образца считается:

- *невалидным*, если в одной из двух пробирок или в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) не зарегистрировано сигнала внутреннего контроля (канал Cy5) или зарегистрирован только сигнал внутреннего контроля и расчетное значение менее 500 клеток (10^3 ГЭ ДНК человека/реакция).
- *отрицательным*, если в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) присутствует сигнал внутреннего контроля (канал Cy5) и во всех четырех пробирках отсутствуют сигналы по другим каналам (Fam, Joe, Rox), а в последних двух пробирках стрипа (3 и 4) отсутствует сигнал по всем четырем флуоресцентным каналам детекции.
- *положительным* – во всех остальных случаях.

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 осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

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. Нажать **OK**.
4. 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**.

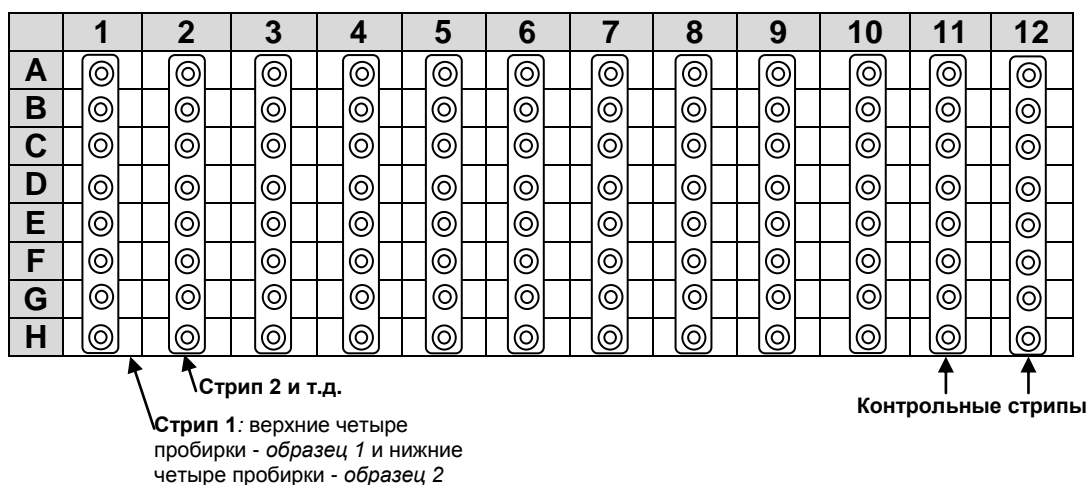
Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. температуры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

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

5. 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.

6. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores...** выбрать галочками все флуорофоры, (FAM, HEX, ROX и Cy5), используемые в данной постановке, и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.
7. 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.
8. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с приведенной ниже и предварительно запрограммированной схемой планшета:



ВНИМАНИЕ! При установке не оставлять пропусков между стрипами (даже если количество стрипов меньше, чем изображено на рисунке), контрольный стрип устанавливать последним.

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

9. Во вкладке **Start Run** запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки.
10. После окончания выполнения программы приступить к анализу результатов.

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. Для каждого канала установить уровень пороговой линии. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить ручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер, и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K2 в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контрольного образца показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Чтобы выделить график образца «K2» (или другого желаемого образца), установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.
4. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов.
5. Для дальнейшей работы с данными можно скопировать результаты значений *Ct* для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета о постановке в формате **.pdf** необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя

файла, нажать **Сохранить**.

Примечание - Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка **Выдать результаты** неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выбрать в меню пункт **Сервис>Макрос>Безопасность...** и установить средний уровень безопасности.

6. Скопировать названия образцов из файла прибора в файл программы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр», скопировать значения пороговых циклов для каждого канала из файла прибора в файл программы. Проверить значения, установленные в программе для калибраторов, они должны совпадать со значениями во вкладыше. Проверить правильность и дополнить подписи образцов. Для корректной обработки данных программой необходимо в колонке **Имя** обозначить калибраторы как **K1 16-18-31; K1 39-45-59; K1 33-35-56-68; K1 51-52-58-66; K2 16-18-31; K2 39-45-59; K2 33-35-56-68; K2 51-52-58-66**, а отрицательные контроли как **OK**.
7. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.
8. После внесения всех данных в матрицу данных Excel нажать кнопку **Выдать результаты**. В колонке **Результат (выявленный генотип)** появятся выявленные в образцах типы ВПЧ.

Интерпретация результатов

Принципы, лежащие в основе автоматического анализа данных:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов, а так же их присутствие или отсутствие анализируются программой автоматической интерпретации результатов.

Эксперимент считается *валидным* если:

- в отрицательных контролях положительный сигнал отсутствует по всем каналам FAM, HEX, ROX, Cy5 .
- в положительном контроле выявляются все 14 типов ВПЧ.

ВНИМАНИЕ! В случае невалидности эксперимента все полученные данные считаются недостоверными, требуется повтор эксперимента.

Результат выявления ДНК ВПЧ и генотипирования для данного образца считается:

- *невалидным*, если в одной из двух пробирок или в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) не зарегистрировано сигнала внутреннего контроля (канал Cy5) или зарегистрирован только сигнал внутреннего контроля и расчетное значение менее 500 клеток (10^3 ГЭ ДНК человека/реакция).
- *отрицательным*, если в двух пробирках стрипа (пробирки 1 и 2) присутствует сигнал внутреннего контроля (канал Cy5) и во всех четырех пробирках отсутствуют сигналы по другим каналам (FAM, HEX, ROX), а в последних двух пробирках стрипа (3 и 4) отсутствует сигнал по всем четырем флуоресцентным каналам детекции.
- *положительным* – во всех остальных случаях.





ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРОГРАММЫ FRT Manager

ВНИМАНИЕ! Данная инструкция описывает минимальную последовательность действий, необходимую для проведения исследования. Для ознакомления со всеми возможностями программного обеспечения рекомендуем прочитать полное руководство пользователя.

1. После выполнения входа в систему перейти к формированию нового задания с

помощью кнопки **Новая постановка**



2. В появившемся окне выбрать используемый амплификатор.
3. В открывшемся окне на закладке **Реакционный блок** выбрать шаблон реакционного блока двойным щелчком левой кнопкой мыши.
4. В закладке **Группа совместимости** выбрать из списка методику с названием **ВПЧ-генотип**.
5. Выбрать в списке **Методики** набор реагентов «ВПЧ ВКР генотип-титр-FL v.2N». Выбрать серию реагентов. Серия реагентов выбирается из выпадающего списка (рис. 15). Если необходимой серии нет в списке, её можно зарегистрировать, нажав кнопку . Для регистрации серии в появившемся окне ввести значения из вкладыша к набору данной серии.
6. Зарегистрировать образцы. Выбрать позицию в роторе или планшете, соответствующую исследуемому образцу. Зарегистрировать образец, введя его обозначение и нажав «ввод/enter» на клавиатуре.
7. Выбрать необходимые контроли и расставить их в соответствующие позиции в роторе или планшете. Добавление и удаление контролей из постановки производится с помощью кнопок   .
8. Указать тип биоматериала для образцов с учётом объема экстракции.
9. Запустить постановку в работу.
10. После завершения программы амплификации и вычисления конечных результатов система отобразит полученные данные для просмотра.
11. После просмотра полученных результатов их можно авторизовать, либо отвергнуть и отправить на повторное проведение исследований.
12. Для просмотра и печати авторизованных результатов необходимо нажать кнопку

Список результатов



в главном меню программы.

Рисунок 15

Новая постановка

Методики

Короткое наименование методики ▼ Контроли

HCV-генотип-FL v.2

ВПЧ ВКР скрин-титр-16-18-FL v.2

EBV / CMV / HHV6- скрин-монитор-FL v.1

EBV / CMV / HHV6-скрин-FL v.1

HSV II - HSV I - T.pallidum-МУЛЬТИПРАЙМ -f

ФлороЦеноз Кандиды v.1

Флороценоз - Бактериальный вагиноз-FL v.5

T. gondii v.1

Candida albicans/Candida spp-титр v.1

ВПЧ ВКР генотип скрин-титр-FL v.2N Все контроли размещены

Образцы методики:

Идентификатор образца

Серия реагентов

Контроли методики:

Наименование (вид би	Тип	Обязательный?	Порядок
K1 HPV gen_titr	Калибратор	Обязательный	0
K2 HPV gen_titr	Калибратор	Обязательный	1
K-	Контроль	Не обязательный	2
V-	Контроль	Обязательный	3

Размещение:

Регистрация образца:

№	Наименование (вид биоматериала)	Смеси
1		16-31-18/glob
2		39-45-59/glob
3		33-35-68-56
4		58-52-66-51
5		16-31-18/glob
6		39-45-59/glob
7	250613--1 Мазок	33-35-68-56
8		58-52-66-51
9		16-31-18/glob
10		39-45-59/glob
11		33-35-68-56
12		58-52-66-51
13	250613--2 Соскоб	16-31-18/glob
14		39-45-59/glob
15		33-35-68-56
16		58-52-66-51
17	250613--3 Соскоб	16-31-18/glob
18		39-45-59/glob
19		33-35-68-56
20		58-52-66-51
21	V-(Контроль)	16-31-18/glob
22		39-45-59/glob
23		33-35-68-56
24		58-52-66-51
25	K-(Контроль)	16-31-18/glob
26		39-45-59/glob
27		33-35-68-56
28		58-52-66-51
29	K1 HPV gen_titr (Калибратор)	16-31-18/glob
30		39-45-59/glob
31		33-35-68-56
32		58-52-66-51
33	K2 HPV gen_titr (Калибратор)	16-31-18/glob
34		39-45-59/glob
35		33-35-68-56
36		58-52-66-51

Наименование постановки Комментарии Электронная почта Назад Сохранить Запустить Отменить

Контролируйте комментарии системы

5

6

8

7

9

8

10

Анализ результатов

1. Анализ результатов происходит автоматически после завершения теста.

2. Результаты постановки в списке завершённых поставок



3. Выбрать постановку и открыть двойным щелчком левой кнопкой мыши.

4. Откроется список результатов всей постановки (вкладка **Результаты**):

Рисунок 16

Идентификатор образца	Методика	Результаты	Значения	Комментарий	Статус		
120613-11	ВПЧ ВК9 генотип скрин-титр-FL v.2N	Ig ВПЧ 16/ 10 ⁴ 5 клеток	-				
		Ig ВПЧ 31/ 10 ⁴ 5 клеток	-				
		Ig ВПЧ 18/ 10 ⁴ 5 клеток	-				
		Ig ВПЧ 39/ 10 ⁴ 5 клеток	-				
		Ig ВПЧ 45/ 10 ⁴ 5 клеток	-				
		Ig ВПЧ 59/ 10 ⁴ 5 клеток	-				
		Ig ВПЧ 33/ 10 ⁴ 5 клеток		3,43			
		Ig ВПЧ 35/ 10 ⁴ 5 клеток		5,55			
		Ig ВПЧ 56/ 10 ⁴ 5 клеток		-			
		Ig ВПЧ 68/ 10 ⁴ 5 клеток		-			
		Ig ВПЧ 58/ 10 ⁴ 5 клеток		-			
		Ig ВПЧ 52/ 10 ⁴ 5 клеток		-			
		Ig ВПЧ 66/ 10 ⁴ 5 клеток		-			
		Ig ВПЧ 51/ 10 ⁴ 5 клеток			9,48		
		СУММ Ig ВПЧ/ 10 ⁴ 5 клеток			9,48		
Клиническая значимость			Повышенная		Новый		

4.1. Результаты постановки имеют флаг: зелёный – без ошибок, красный – с ошибками, жёлтый – отсутствуют необязательные контроли или использованы реагенты с истёкшим сроком годности.

4.2. Значения вирусной нагрузки *HPV* для образцов в Ig ВПЧ/10⁵ клеток.

5. Перейти во вкладку **Подробно** для анализа результатов:

Рисунок 17

Вся постановка № 42

Заменить Печать результатов Авторизовать постановку Повторный анализ постановки Редактировать Параметры расчёта

Вся постановка АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип скрин-титр-FL v.2N

Результаты Подробно Orange Yellow Red Green

Серия 10.06.13

Методика: АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип скрин-титр-FL v.2N
 Серия: 10.06.13
 Дата: 12.06.2013 10:11:04

Модель прибора: Rotor-Gene 6000
 Наименование прибора: Rotor-Gene 6000

Статус: Зелёный
 Комментарий:

Результаты образцов:

ID образца	Биоматериал	Поз.	Ig ВПЧ 16/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 31/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 18/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 39/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 45/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 59/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 33/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 35/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 56/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 68/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 58/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 52/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 66/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 51/ 10 ⁴ клеток	СУММ Ig ВПЧ/ 10 ⁴ клеток	Клиническ ая значимост ь
120613-11	Не определён	1, 2, 3, 4	-	-	-	-	-	-	3,43	5,55	-	-	-	-	-	9,48	9,48	Повышенна я

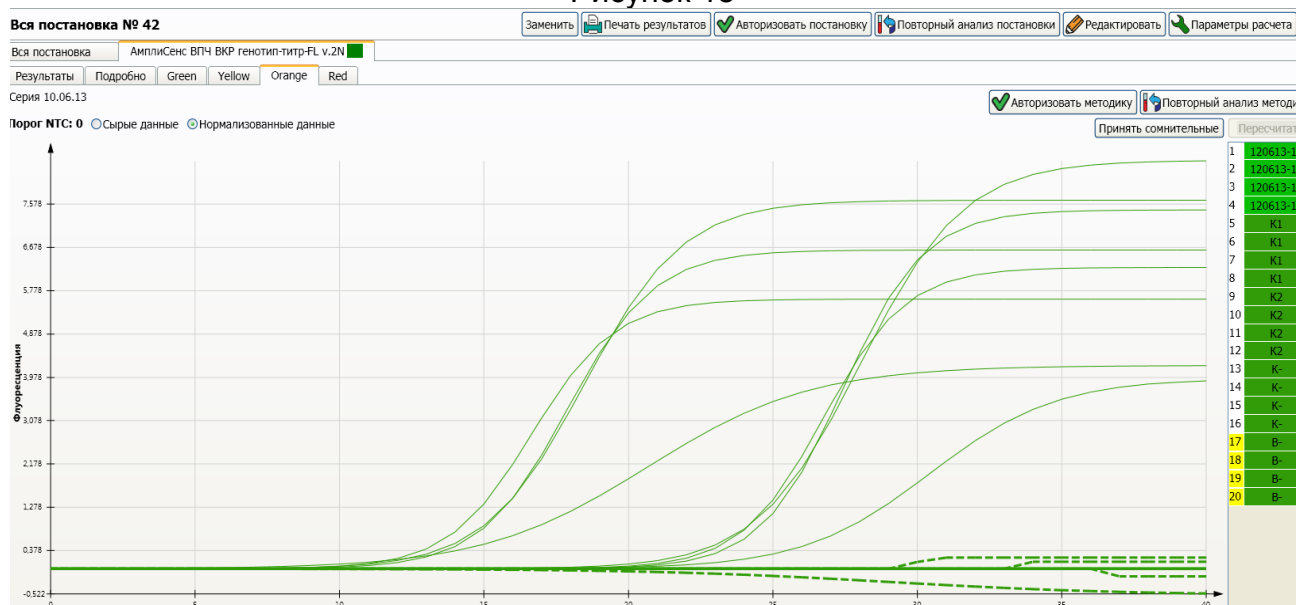
Результаты контролей:

ID образца	Поз.	Ig ВПЧ 16/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 31/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 18/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 39/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 45/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 59/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 33/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 35/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 56/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 68/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 58/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 52/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 66/ 10 ⁴ клеток	Ig ВПЧ 51/ 10 ⁴ клеток	СУММ Ig ВПЧ/ 10 ⁴ клеток	Клиническ ая значимост ь
K1 НРV gen_titr (Калибратор)	5, 6, 7, 8	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
K2 НРV gen_titr (Калибратор)	9, 10, 11, 12	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
K-(Контроль)	13, 14, 15, 16	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

Комментарий Подтвердить Закрыть

- 5.1. Основные результаты для образцов и контролей имеют флаг: зелёный – без ошибок, красный – с ошибками.
- 5.2. Дополнительные результаты для образцов и контролей: значения пороговых циклов (C_t), коэффициенты корреляции, эффективность реакции, коэффициенты калибровочных графиков (K и B), калибровочные графики.
6. Перейти во вкладки графиков флуоресцентной детекции. Убедиться, что нет артефактных данных.

Рисунок 18



6.1. Результаты графиков детекции просмотреть в сырых и нормализованных данных Порог NTC: 0 Сырые данные Нормализованные данные

6.2. Результаты графиков оцениваются следующим образом:

Тип кривой	Результат
	«Положительный»
	«Отрицательный»
	«Сомнительно положительный»
	«Сомнительно отрицательный»

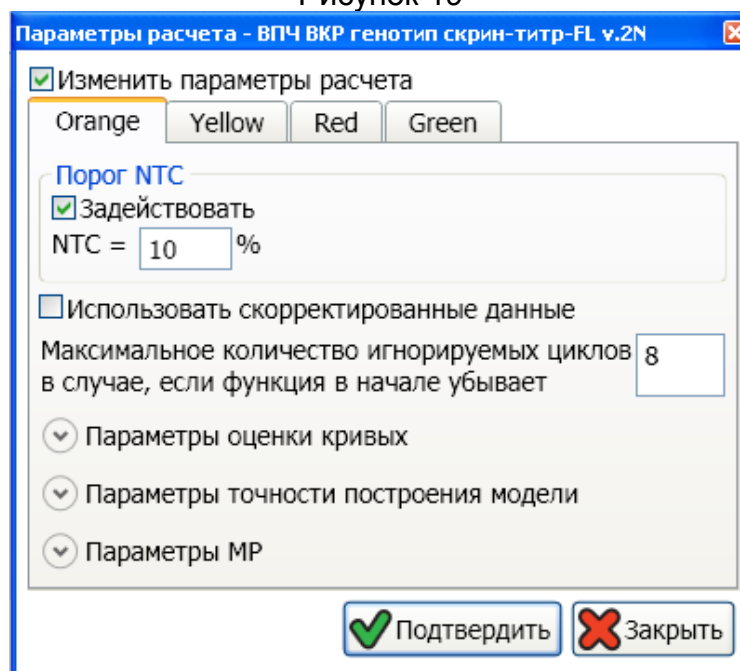
Сомнительные кривые помечаются жёлтым флагом , правой кнопкой мыши можно изменить сомнительный результат на


«положительный» или «отрицательный» . После

изменения флаг становится синим . Также принять все сомнительные результаты можно кнопкой **Принять сомнительные** и **Пересчитать**

6.3. Для изменений параметров обработки результатов нажать на кнопку **Параметры расчёта** . Можно изменить параметры расчёта и пересчитать результаты кнопкой **Подтвердить**. В параметрах расчёта можно применить/изменить устранение выбросов (NTC в %).

Рисунок 19



6.4. Для сохранения файла методики в программном обеспечении прибора нажать кнопку **Сохранить сырые данные в исходном формате** .

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Появление любого значения C_t по каналам FAM/Green, JOE/HEX/Yellow, ROX/Orange и/или Cy5/Red в таблице результатов для отрицательного контроля этапа экстракции (OK) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение C_t в таблице результатов для калибраторов ПЦР по каналам FAM/Green, JOE/HEX/Yellow, ROX/Orange и/или Cy5/Red отсутствует или превышает граничные значения, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК возбудителя.
3. Если для данного образца не определено значение порогового цикла C_t или оно превышает граничное значение по каналам FAM/Green и/или JOE/HEX/Yellow, ROX/Orange, а также Cy5/Red в пробирках 3 и 4, а по каналу Cy5/Red в 1 и 2 пробирках получено значение C_t , превышающее граничное, необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа экстракции. Возможная причина – ошибка в процедуре подготовки биологического материала, приведшая к потере ДНК или наличие ингибиторов ПЦР.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
28.01.15 PM	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
04.02.15 PM	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских и иных немедицинских целей»
14.04.15 ChA	Меры предосторожности	Откорректирована таблица с опасными реагентами
10.11.15 PM	Меры предосторожности	Раздел актуализирован в соответствии с шаблоном
26.04.18 PM	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи прибора iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) Проведение амплификации и анализ результатов при помощи прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) Проведение амплификации, анализ и учет результатов при помощи прибора CFX96 (Bio-Rad, США)	Уточнен анализ результатов
13.08.18 PM	Меры предосторожности	Таблица с опасными реагентами переработана в соответствии с требованиями Регламента (ЕС) 1272/2008 и ГОСТ 31340-2013
	По тексту	«Учет результатов» замен на «Интерпретация результатов»
23.01.20 MA	Нижний колонтитул	Добавлен новый каталожный номер Формат FRT Форма 2: REF H-3922-1-13-0