

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для количественного определения ДНК вирусов папилломы

человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР)

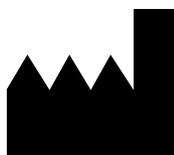
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов

в биологическом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

«АмплиСенс[®] ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL»

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	4
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 LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β -глобинового гена человека)
ВПЧ ВКР	- вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K-	- отрицательный контроль ПЦР
OK	- отрицательный контроль экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-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);
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Комплекты реагентов, рекомендованные для экстракции ДНК

Для экстракции ДНК из исследуемого материала с целью дальнейшего ПЦР-исследования с использованием набора реагентов **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL»** ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора рекомендует следующие комплекты реагентов:

- «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из мазков со слизистой оболочки влагалища и образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов;
- «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» для экстракции ДНК из мазков со слизистой оболочки влагалища и образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов;
- «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» для экстракции ДНК из образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, взятых в среду для жидкостной цитологии в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов.

Соответствие мишеней и каналов детекции

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Название канала детекции для разных моделей приборов ¹	FAM/ Green	JOE/ HEX/ R6G/ Yellow/ Cy3	ROX/ Orange/ TxR	Cy5/ Red	Cy5.5/ Crimson/ Quasar705
ДНК-мишень	ДНК ВПЧ ВКР генотип 16	ДНК ВПЧ ВКР генотип 18	генотипы 16,18,31,33,35, 39,45,51,52,56, 58,59,66,68	ДНК участка β -глобинового гена (ВКО Glob)	ДНК ВПЧ ВКР генотип 45
Область амплификации	E6 gene	E6 gene	E1 gene (для генотипов 16,31, 33,35,52, 58)/ E2 gene (для генотипов 18,39, 45,56,59,66,68)/ E7 gene (для генотипа 51)	β -глобиновый ген	E6 gene

¹ В каждом разделе методических рекомендаций названия каналов детекции даны в соответствии с описываемым прибором.

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 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 тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

Программирование амплификатора:

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

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*). Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных наборов реагентов или с разными ПЦР-смесями-FL, то в программе Rotor-Gene необходимо указать номера пробирок для калибровки по каждому каналу детекции (см п.7). Рекомендации по калибровке изложены в информационном листе «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)».

Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
2. Во вкладке выбрать шаблон **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл** для редактирования и нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

**Единая программа амплификации и
детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»**

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	15 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	10 с	–	align="center">45
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

**Программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»**

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс» для выявления и генотипирования вирусов папилломы человека (ВПЧ ВКР) и выявления ДНК возбудителей ИППП. Поэтому можно одновременно в одном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание.

6. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **ОК/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне:

- а) для оптимизации измерения сигнала по выбранным каналам установить калибровку от **5FI** до **10FI** для всех каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson.

Для этого нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-
мых**, в открывшемся для первого канала окне (**Auto Gain Optimisation Channel Settings/Auto Gain Calibration Channel Settings/Установки Авто-
оптимизации уровня сигнала**) указать в строке **Target Sample Range/Нужный диапазон стартового сигнала** значения минимального и максимального сигнала, нажать кнопку **ОК**. Автоматически откроется окно для следующего канала. Проверить выбранные для всех каналов значения можно в графах **Min Reading/Миним. Сигнал, Max Reading/Максим. Сигнал**.

ВНИМАНИЕ! Дополнительные требования к выставлению диапазонов калибровки каналов указаны в информационном листе «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмБХ»), Германия)».

- б) осуществлять калибрование по выбранным каналам 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**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**. Для сохранения запрограммированного шаблона, необходимо, нажав кнопку **Save Template/Сохр.шаблон**, задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации - «ВПЧ ВКР скрин-титр-14». Сохранить файл в предлагаемую папку: **Templates\Quick Start Templates**; закрыть окно **New Run Wizard/Мастер Нового Теста**. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне **New Run/Новый тест**.

Использование готового шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**, затем в списке шаблонов выбрать шаблон «ВПЧ ВКР скрин-титр-14», запрограммированный согласно описанию в разделе **Создание шаблона**.
2. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
3. В открывшемся окне, проверить, что указан объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, равный **25** мкл. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий авто-оптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. При этом ротор с образцами должен быть уже закреплен и крышка прибора закрыта. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
5. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», ДНК-калибраторы K1 и K2 ВПЧ скрин – «K1» и «K2». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, отрицательного контроля ПЦР – тип **Negative**

control/Отрицательный контроль. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**. Нажать кнопку **Finish/OK/Закончить**.

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

Примечание – Для редактирования таблицы образцов до старта нужно, чтобы предварительно в меню **File/Файл** подменю **User preferences/Предпочтения** был выбран пункт **Edit Samples Before Run Started/Редактировать образцы перед стартом теста**.

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene. 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. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,03**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quantitation Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson

провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

<i>Канал</i>	<i>Threshold / Порог</i>	<i>Dynamic tube/ Динамич.фон</i>	<i>Slope Correct / Коррект. уклона</i>	<i>More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов</i>
FAM/Green	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,03	включена	включена	10%
ROX/Orange	0,03	включена	включена	7%
Cy5/Red	0,03	включена	включена	10%
Cy5.5/Crimson	0,03	включена	включена	15%

ВНИМАНИЕ! В случае, если кривые флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson не соответствуют экспоненциальному росту, допускается увеличение значения порога отрицательных проб (*NTC threshold /Порог Фона – ПФ*) до 15%.

- В таблице результатов (*Quant. Results/Количественные результаты*): выделить колонку *Name/Имя* однократно щелкнув мышью на заголовке. Скопировать колонку, выбрав *Сору/Копировать* из контекстного меню (вызывается правой кнопкой мыши).
- Открыть на диске, прилагающемся к набору реагентов, шаблон расчета результатов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14.xls» в формате Microsoft® Excel для обработки данных и получения результатов, согласитесь на включение макроса.

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

- Установить курсор на ячейку *Обозначение образца* и выбрать *Paste/Вставить* из контекстного меню.
- Аналогично выбрать и скопировать колонку *Ct* из таблицы результатов (*Quant. Results/Количественные результаты*). Установить курсор в таблице Excel в ячейку *СТ* под названием соответствующего канала детекции в колонке *Порог. циклы*.
- Повторить процедуру для других флуоресцентных красителей каналов детекции.
- 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 необходимо в колонке **Обозначение образца** обозначить калибраторы как **K1, K2** а отрицательные контроли как **OK, K-**.

15. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку результаты.

В колонке **Результаты** появятся результаты обработки полученных данных.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК ВПЧ в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы Rotor-Gene 3000/6000/Q.

Возможные проблемы	Причина	Признаки	Способы устранения
Отрицательные образцы анализируются программой Rotor-Gene как положительные	Неправильная математическая обработка отрицательных образцов при наличии участка падения флуоресценции на начальных циклах	Типичный положительный образец имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид довольно прямых линий, идущих снизу вверх	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	На графике обработанных кривых флуоресценции красная линия порога (Threshold) пересекает или «задевает» кривые флуоресценции в левой части графика (первые циклы)	Необходимо воспользоваться функцией Eliminate cycles before.../Исключить циклы до... , задав значение 5 (игнорируется пересечение порога и кривой флуоресценции на первых 5 циклах)
Отсутствие флуоресцентных кривых при значениях флуоресценции меньше 1 или больше 100	Не задан параметр автокалибровки от 5FI до 10FI или ошибка в первой пробирке ротора (ее отсутствие, неправильное внесение образца ДНК или	Большинство фоновых сигналов флуоресценции меньше 1 или больше 20	Повторить ПЦР, задав параметры по калибровке согласно информационному листу «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на

единиц	реакционной смеси)		амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)»
--------	--------------------	--	---

Информацию по всем установленным параметрам эксперимента, а также отчет по автокалибровке можно найти, просмотрев установки эксперимента (кнопка **Settings/Установки**). В частности, вкладка **Messages/Сообщения** пункт **Autocalibration Log Messages/Сообщение об авто-оптимизации уровня сигнала** – отчет об автокалибровке.

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

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ 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, запустить программу RealTime_PCR v.7.3, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. 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**.

Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** на верхней панели выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста «**ВПЧ ВКР скрин-титр-14**» и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – **Пороговый (Ct)**;
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль+, контроль**;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – **25 мкл**;
 - **Флуорофоры** – Fam, Hex, Rox, Cy5,5 – специфика, Cy5 – ВКО;
 - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	Fam, Hex/R6G, Rox, Cy5, Cy5.5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50°С – 15 минут) для экономии времени.

**Программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»**

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	Fam, Hex/R6G, Rox, Cy5, Cy5.5	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс» для выявления и генотипирования вирусов папилломы человека (ВПЧ ВКР) и выявления ДНК возбудителей ИППП. Поэтому можно одновременно в одном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание.

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**ВПЧ ВКР скрин-титр-14**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. 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 переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.

7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Использование готового шаблонного файла для проведения теста

Для запуска прибора можно также использовать ранее созданный шаблон теста с заданными параметрами амплификации и заданным количеством контролей. Для этого:

- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «ВПЧ ВКР скрин-титр-14», указать количество образцов, нажать **ОК**.
- присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
- в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

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 *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
 - **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**.
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) 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 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. Для дальнейшей работы с данными скопировать результаты значений *St* для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета в виде файла Word нажать кнопку **Отчет по результатам анализа** . Далее выбрать галочками параметры, необходимые для отображения в отчете, нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат **«*MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML»** и папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.
7. Открыть на диске, прилагающемся к набору реагентов, шаблон расчета результатов **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14.xls»** 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 **Рассчитать** 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 **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14.xls»**, скопировать значения пороговых циклов для каждого канала из файла прибора в файл шаблона. Проверить значения, установленные в шаблоне для калибраторов, они должны совпадать со значениями во вкладыше. Проверить правильность и дополнить подписи образцов. Для корректной обработки данных необходимо в колонке **Обозначение образца** обозначить калибраторы как **K1** и **K2**, а отрицательные контроли как **OK, K-**.

9. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.
10. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Рассчитать**.
В колонке **Результаты** появятся результаты обработки полученных данных.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК ВПЧ в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы RealTime PCR v.7.3.

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид)	Установить линию порога так, чтобы она пересекала только сигмообразные кривые накопления флуоресценции или на высоте $\frac{1}{4}$ от высоты между конечным значением флуоресценции отрицательных и положительных образцов
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца

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:

1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar 705	

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. Ниже). Нажать **OK**.

1	50,0	C for 15:00
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
2	95,0	C for 15:00
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
→ 3	95,0	C for 0:10
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	60,0	C for 0:20
		+ Plate Read
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
← 5	GOTO 3	,44 more times

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50°C – 15 минут) для экономии времени.

**Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
«АмплиСенс-1»**

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
3	95	5 с	—	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705	
	72	15 с	—	

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. Ниже). Нажать **OK**.

```

1 95,0 C for 15:00
2 95,0 C for 0:05
  Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3 60,0 C for 0:20
  Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4 72,0 C for 0:15
  Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5 GOTO 2 , 4 more times
6 95,0 C for 0:05
  Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7 60,0 C for 0:30
  + Plate Read
  Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8 72,0 C for 0:15
  Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
9 GOTO 6 , 39 more times
END

```

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс» для выявления и генотипирования вирусов папилломы человека (ВПЧ ВКР) и выявления ДНК возбудителей ИППП. Поэтому можно одновременно в одном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание.

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...**. В появившемся окне **Plate Editor – New** задать расположение пробирок в модуле.

Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar 705** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по всем каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
6. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

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

7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Использование готового шаблона для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет

наличие (или отсутствие) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

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 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 «K1» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

3. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов.
4. Правой кнопкой мыши щелкнуть на ячейку **Well** в таблице результатов.
5. Выделить все содержимое таблицы результатов, скопировать.
6. Открыть на диске, прилагающемся к набору реагентов, шаблон расчета результатов «**АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14.xls**» в формате Microsoft® Excel для обработки данных и получения результатов, согласитесь на включение макроса.

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

7. В файле прибора щелкнуть правой кнопкой мыши на ячейку **Имя** в таблице

результатов, выделить все содержимое таблицы и скопировать названия образцов в файл «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14.xls», скопировать значения пороговых циклов для каждого канала из файла прибора в файл шаблона. Проверить значения, установленные в шаблоне для калибраторов, они должны совпадать со значениями во вкладыше. Проверить правильность и дополнить подписи образцов. Для корректной обработки данных необходимо в колонке **Обозначение образца** обозначить калибраторы как **K1** и **K2**, а отрицательные контроли как **OK**, **K-**.

8. Сохранить файл Microsoft® Excel под другим именем.
9. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажать кнопку **Рассчитать**. В колонке **Результаты** появятся результаты обработки полученных данных.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК ВПЧ в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы Bio-Rad CFX Manager

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид)	Установить линию порога так, чтобы она пересекала только сигмообразные кривые накопления флуоресценции или на высоте $\frac{1}{4}$ от высоты между конечным значением флуоресценции отрицательных и положительных образцов
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца