

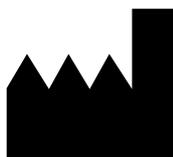
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для одновременного выявления и количественного
определения ДНК возбудителей ИППП в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] ФлороЦеноз / Микоплазмы-FL»

АмплиСенс[®]



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).....	5
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай).	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США).....	19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).....	24
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США)	29

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β -глобинового гена человека)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ОТ-ПЦР
К-	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПО	- программное обеспечение
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 одновременного выявления и количественного определения ДНК *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Микоплазмы-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);
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США);
- «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия);
- CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»),США).

ВНИМАНИЕ! Шаблон расчета результатов в формате Microsoft Excel находится на официальном сайте Изготовителя.

Соответствие мишеней и каналов детекции

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5
Название канала детекции для разных моделей приборов ¹	FAM/ Green	JOE/ HEX/ R6G/ Yellow/ Cy3	ROX/ Orange/ TxR	Cy5/ Red
ДНК мишень	ДНК <i>U.parvum</i>	ДНК <i>U.urealyticum</i>	ДНК <i>M.hominis</i>	ДНК участка β-глобинового гена

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

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene 6 версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q – русифицированную программу Rotor-Gene 6000 версии 1.8.17.5 (или выше) или 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 англоязычной версии программы 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 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

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/Hydrolysis 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** равный **25** мкл. Установить галочку напротив позиции **15 µL oil layer volume/15 µL с добав. воска**. 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** следует задать программу амплификации.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

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	
	72	15 с	–	

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

Примечание – Канал **Cy5.5/Crimson** включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

6. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **ОК/Да**.

7. Задать автоматическую калибровку для выбора параметра **Gain/Усиление сигнала**. Для этого в окне **Channel Setup/Установки каналов** выбрать кнопку **Gain Optimisation/Опт. уровня сигн.** В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup/Автооптимизация уровня сигнала** нажать кнопку **Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**, пометить галочкой бокс в строке **Perform Optimisation Before 1-st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для канала **FAM/Green** нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение 5, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение 10. Для каналов **JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Crimson** нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение 4, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение 8. В графе **Tube position/Позиция Пробирки** указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр **Gain/Усиление сигнала**. По умолчанию это – 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью (любой). (см примечание 1). Закрыть окно **Auto Gain Calibration Setup/Автооптимизация уровня сигнала**.

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, Германия)».

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 – **«АмплиСенс-1»**. 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. Установить пробирки в ротор (ячейки карусели пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе). Установить фиксирующее кольцо, прикрепить ротор, совместив отверстие для фиксатора с фиксатором, закрыть крышку прибора.

ВНИМАНИЕ! В первой позиции должна быть установлена одна из подготовленных для анализа пробирок с реакционной смесью (см. примечания 1 и 2).

2. Нажать кнопку **New/Новый**, в основном меню программы. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** выбрать вкладку **Advanced Start/Детальный мастер**, затем в списке шаблонов выбрать шаблон **«АмплиСенс-1»**, запрограммированный согласно описанию в разделе **Создание шаблона**
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**. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне, проверить, что указан объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, равный **25 мкл**, и напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска** установлена галочка, активирующая эту опцию. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий автооптимизации 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).

- Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов, контролей и калибраторов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «K-». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, отрицательного контроля ПЦР – тип **Negative control/Отрицательный контроль**. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 выбрать тип **Standard/Стандарт** и в колонке **Given conc./Концентрация** ввести значения, указанные во вкладыше к данной серии набора реагентов. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**. Нажать кнопку **Finish/OK/ Закончить**. Отредактировать таблицу образцов можно также после старта выполнения программы амплификации.

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**.

См. также примечание 3.

Примечание 1. **Первая пробирка в роторе** используется для автоматической оптимизации уровня сигнала, поэтому в 1-ой позиции в роторе должна находиться пробирка с реакционной смесью. При одновременном проведении различных тестов для выявления ДНК возбудителей ИППП с помощью наборов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в качестве 1-ой пробирки можно использовать пробирку с любой из подготовленных реакционных смесей. При одновременном проведении тестов с использованием наборов серии «МУЛЬТИПРАЙМ» в 1-ю позицию в роторе необходимо помещать пробирку с реакционной смесью набора реагентов серии «МУЛЬТИПРАЙМ», для которого используется максимальное число каналов.

Примечание 2. Нельзя использовать для заполнения ротора пробирки с ПЦР-смесью, ранее уже прошедшие амплификацию. Ячейки ротора допустимо оставлять незаполненными.

Примечание 3. При одновременном проведении тестов для выявления ДНК ВПЧ ВКР и различных тестов для выявления ДНК возбудителей ИППП с помощью

наборов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора следует в таблице образцов создать вторую страницу и в ней задать образцы, для которых проводится тест на наличие ДНК ВПЧ (тип **образец**), а для остальных образцов назначить тип **пустой**. Это имеет значение для последующего анализа результатов.

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 в таблице результатов.

В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК.

Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green:

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **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** и **Slope Correct/Коррект. уклона**.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1** (см. табл. 2)
7. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона – ПФ(NTC)** равным **10-20%** (см. табл. 2).
8. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct* и значения концентрации в столбце **Calc Conc (copies/reaction)**.
9. В отрицательном контроле выделения (В-) – не должно быть каких-либо значений *Ct*.

10. В отрицательном контроле ПЦР (К-) – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
11. В ДНК-калибраторах должны появиться значения *Ct* по каналу FAM/Green.
12. Особое внимание следует обратить на окно **Standard Curve/Станд. Кривая**, значение коэффициента R^2 (коэффициента корреляции) должно быть не менее 0,99. Разница циклов *Ct*«UG2» - *Ct*«UG1» находится в пределах 10 ± 1 цикла.

Анализ результатов по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 2

Канал	Threshold/Порог	More Settings / Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона
FAM/Green	0,1	10-20 %	включена
JOE/Yellow	0,1	10-20 %	включена
ROX/Orange	0,1	10-20 %	включена
Cy5/Red	0,1	10-30 %	включена

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Выражение конечного результата концентрации ДНК выявляемых возбудителей возможно в двух вариантах – в абсолютных и в относительных (нормированных) значениях.

В обоих случаях предварительно необходимо оценить концентрацию ДНК ВКО (Glob) в исследуемых образцах соскобного отделяемого слизистой оболочки влагалища, соскобов из уретры и цервикального канала это значение должно превышать 10^3 и 10^2 геномных эквивалентов человека на реакцию для женщин и мужчин, соответственно.

ВНИМАНИЕ! В случае использования в качестве клинического материала образцов мочи количество геномных эквивалентов человека на реакцию может быть менее 10^3 у женщин и менее 10^2 у мужчин.

Абсолютные значения концентрации возбудителя

Абсолютные значения концентраций ДНК выявляемых возбудителей отражают

общее содержание микроорганизмов во взятом клиническом материале, помещенном в транспортную среду.

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК возбудителя

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток слизистой человека. Полученные значения количества геномных эквивалентов *возбудителя* нормируют на 100 тыс клеток человека. Кроме того, значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия клинического материала.

Расчеты проводятся с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel. Для этого необходимо скопировать данные *Ct* для всех каналов в шаблон расчета результатов, контрольные образцы и калибраторы назвать согласно инструкции к шаблону расчета результатов, нажать кнопку **Рассчитать**.

Возможные ошибки

1. Появление значения более 5 копий на реакцию (500 копий/мл) в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (OK) и/или этапа ПЦР (K-) на канале Cy5/Red свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, в которых обнаружена ДНК определяемого возбудителя, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если при выявлении ДНК микроорганизмов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (OK) и/или этапа ПЦР (K-) регистрируется сигнал по каналам для детекции этих микроорганизмов, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла по соответствующим каналам.
3. Если для ДНК калибраторов (UG1, UG2) значение порогового цикла по каналам FAM/Green и/или JOE/Yellow ROX/Orange и Cy5/Red отсутствует, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
4. Разница $Ct(UG2) - Ct(UG1)$ больше 10 ± 1 свидетельствует о сбое калибровки. Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. При повторном получении неудовлетворительного результата повторить ПЦР для всех проб и калибраторов.

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

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

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

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

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 оптический модуль за 20–30 мин до проведения реакции.
2. Назначить для выполнения универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1» (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

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, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

Для этого выбрать или создать эту программу в модуле **Protocol (View Protocols)** для iCycler iQ). Для iCycler iQ назначить программу к выполнению, нажав кнопку **Run with selected Plate Setup**.

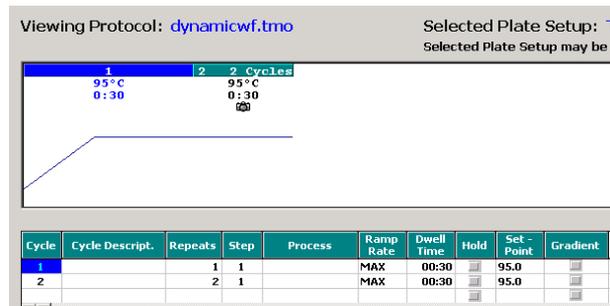
Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения амплификации и детекции при использовании комплектов реагентов «ПЦР-комплект» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для выявления ДНК возбудителей ИППП.

ВНИМАНИЕ! Для прибора **iCycler iQ** не рекомендуется одновременно выполнять амплификацию и детекцию с использованием наборов в формате «мультипрайм» и наборов для выявления одного микроорганизма (т.е. тесты, в которых используются разные комбинации детектируемых каналов). Если требуется выполнять такие тесты одновременно, то **необходимо** при запуске выбрать для измерения факторов лунок вариант **External Well Factors Plate** и использовать для процедуры запуска набор

пробирок со специальным раствором **External Well Factor Solution** (производства Bio-Rad).

ВНИМАНИЕ! Для прибора **iCycler iQ** необходимо проверить, чтобы протокол **dynamicwf.tmo** соответствовал стандартному, как показано ниже. Если этот протокол был изменен и не соответствует указанному, его необходимо исправить.

Протокол **dynamicwf.tmo** для прибора **iCycler iQ**:



3. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, отрицательные контроли как «-». Калибраторы UG1 и UG2 по каналам **FAM**, **JOE/HEX**, **ROX** и **Cy5** задать как **Standard** и указать концентрацию из вкладыша к набору реагентов. При задании калибраторов кнопка **Whole Plate Loading** должна быть не активирована. Для всех образцов и калибраторов задать измерение флуоресценции по четырем каналам **FAM**, **JOE/HEX**, **ROX** и **Cy5**.
4. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
5. Для запуска прибора нажать кнопку **Run** (для прибора iQ5) или **Run with selected protocol** (для прибора iCycler iQ). В открывшемся окне указать объем образца **25 мкл**. Для прибора iCycler iQ использовать способ определения фактора лунок по экспериментальному планшету **Experimental Plate**. Для прибора iQ5 допускается использование как режима с измерением факторов лунок по экспериментальным пробиркам, так и фиксированных факторов лунок (рекомендуется). Нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.
6. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрывать крышку прибора.
7. Запустить выполнение выбранной программы «**АмплиСенс-1**» с заданной схемой планшета.
 - Для прибора **iQ5** перед запуском выполнения программы анализа следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Use Persistent Well Factors** (предлагается

по умолчанию).

- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать под строкой **Select well factor source** вариант **Experimental Plate** (предлагается по умолчанию) для измерения факторов лунок (см. пункт 2). Задать объем реакционной смеси **-25 мкл**. Для запуска нажать кнопку **Run**.

8. После окончания выполнения программы можно приступить к анализу результатов.

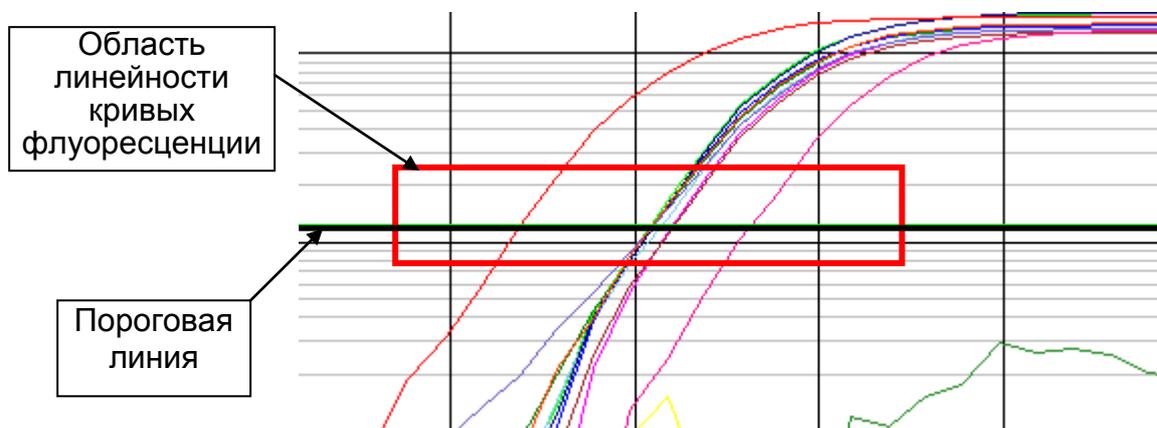
9. По окончании работы с прибором необходимо закрыть программу и выключить прибор (амплификатор и блок оптической системы).

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. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК.

1. Запустить программу и 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 по графику образца ДНК-калибратора UG1 в последнем цикле

амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для ДНК-калибратора UG1 показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.



В таблице результатов (окно Quant. Results) появятся значения Ct для анализируемого канала.

- Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant** (для прибора iCycler iQ) или активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (для прибора iQ5).

Для дальнейшей работы с данными щелкнуть правой кнопкой мыши на появившейся таблице с результатами. В выпадающем меню выбрать **Export to Excel**, сохранить файл в необходимую папку.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Выражение конечного результата концентрации ДНК выявляемых возбудителей возможно в двух вариантах – в абсолютных и в относительных (нормированных) значениях.

В обоих случаях предварительно необходимо оценить концентрацию ДНК ВКО (Glob) в исследуемых образцах соскобного отделяемого слизистой оболочки влагалища соскобов из уретры и цервикального канала это значение должно превышать 10^3 и 10^2 геномных эквивалентов человека на реакцию для женщин и

мужчин, соответственно.

ВНИМАНИЕ! В случае использования в качестве клинического материала образцов мочи количество геномных эквивалентов человека на реакцию может быть менее 10^3 у женщин и менее 10^2 у мужчин.

Абсолютные значения концентрации возбудителя

Абсолютные значения концентраций ДНК выявляемых возбудителей отражают общее содержание микроорганизмов во взятом клиническом материале, помещенном в транспортную среду.

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК возбудителя

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток слизистой человека. Полученные значения количества геномных эквивалентов *возбудителя* нормируют на 100 тыс клеток человека. Кроме того, значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия клинического материала.

Расчеты проводятся с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel. Для этого необходимо скопировать данные C_t для всех каналов в шаблон расчета результатов, контрольные образцы и калибраторы назвать согласно инструкции к шаблону расчета результатов, нажать кнопку **Рассчитать**.

Возможные ошибки

1. Появление значения более 5 копий на реакцию (500 копий/мл) в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (OK) и/или этапа ПЦР (K-) по каналу Cy5 свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, в которых обнаружена ДНК определяемого возбудителя, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если при выявлении ДНК микроорганизмов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (OK) и/или этапа ПЦР (K-) регистрируется сигнал по каналам для детекции этих микроорганизмов, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла по соответствующим каналам.
3. Если для ДНК калибраторов ПЦР (UG1, UG2) значение порогового цикла по каналам FAM и/или JOE/HEX, ROX и Cy5 отсутствует, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
4. Разница $C_t(UG2) - C_t(UG1)$ больше 10 ± 1 свидетельствует о сбое калибровки.

Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. При повторном получении неудовлетворительного результата повторить ПЦР для всех проб и калибраторов.

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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Stratagene 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, закрыть крышку.
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. Закрыть фиксатор и дверцу прибора.
6. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью).
 - обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить четыре флажка: **FAM**, **JOE**, **ROX** и **Cy5**.
 - дважды щелкая по каждой ячейке внести подписи пробирок (окно **Well Information**), отрицательный контроль обозначьте как «-». Калибраторы **UG1** и **UG2** задать в окне **Well type** как **Standard**; по каналам **FAM**, **JOE/HEX**, **ROX** и **Cy5** и указать концентрацию (в окне **Standard quantity**). *Внести подписи образцов и значения калибраторов так же можно после окончания амплификации, вернувшись на эту вкладку.*
7. Задать программу амплификации. Для этого использовать один из следующих способов:
 - а) **Использование шаблонного файла для задания программы**

амплификации (рекомендуется)

Перейти во вкладку **Thermal Profile Setup**. Нажать кнопку **Import...** справа от изображения профиля термоциклирования. Перейти в папку, содержащую предшествующий экспериментальный файл, и открыть его. В окне **Thermal Profile** появиться необходимый профиль термоциклирования.

б) Самостоятельное программирование

После задания всех необходимых значений и параметров, снова выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки. Перейти во вкладку **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации (см. табл. 4).

Таблица-4

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

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, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! С использованием универсальной программы «АмплиСенс-1» можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов для выявления ДНК возбудителей ИППП, включая тесты для выявления и генотипирования вирусов папилломы человека, с помощью комплектов реагентов «ПЦР-комплект» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в которых используется не более четырех каналов детекции.

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.

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

Анализ результатов.

Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения прибора Mx3000P, Mx3005P по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице

результатов). В соответствии со значениями C_t калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК/

1. В программе Mx3000P 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 на вкладку **Results**.
4. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысить уровень порога. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного по графику образца ДНК-калибратора **UG1** в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для ДНК-калибратора **UG1** показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Для этого в нижней панели **Dyes shown** активировать отображение флуоресцентного канала FAM и отключить все остальные каналы. Просмотреть положение линии порога, при необходимости изменить. Далее, последовательно включая отображение следующего канала и отключая предыдущий, просмотреть положение порогов.

По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, необходимо дважды щелкнуть левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties** для оси Y (Y axis) поставить галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**.

5. Далее активировать отображение четырех флуоресцентных каналов (кнопки **FAM, JOE, ROX, Cy5** нажаты в поле **Dyes Shown** внизу окна программы).
6. В поле **Area to analyze** выбрать пункт **Text Report**. Визуально удостовериться, что все данные сортированы по имени красителя (колонка **Dye**). Для этого однократно нажать на имя колонки **Dye**.
7. Перейти в меню **File**, далее к пункту **Export Text Report** и далее к пункту **Export Text Report to Excel**. Откроется окно Microsoft Excel.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Выражение конечного результата концентрации ДНК выявляемых возбудителей возможно в двух вариантах – в абсолютных и в относительных (нормированных) значениях.

В обоих случаях предварительно необходимо оценить концентрацию ДНК ВКО (Glob) в исследуемых образцах соскобного отделяемого слизистой оболочки влагалища соскобов из уретры и цервикального канала это значение должно превышать 10^3 и 10^2 геномных эквивалентов человека на реакцию для женщин и мужчин, соответственно.

ВНИМАНИЕ! В случае использования в качестве клинического материала образцов мочи количество геномных эквивалентов человека на реакцию может быть менее 10^3 у женщин и менее 10^2 у мужчин.

Абсолютные значения концентрации возбудителя

Абсолютные значения концентраций ДНК выявляемых возбудителей отражают общее содержание микроорганизмов во взятом клиническом материале, помещенном в транспортную среду.

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК возбудителя

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток слизистой человека. Полученные значения количества геномных эквивалентов *возбудителя* нормируют на 100 тыс клеток человека. Кроме того, значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия клинического материала.

Расчеты проводятся с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel. Для этого необходимо скопировать данные *Ct* для всех каналов в шаблон расчета результатов, контрольные образцы и калибраторы назвать согласно инструкции к шаблону расчета результатов, нажать кнопку ***Рассчитать***.

Возможные ошибки

1. Появление значения более 5 копий на реакцию (500 копий/мл) в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (OK)

- и/или этапа ПЦР (K-) на канале Cy5 свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, в которых обнаружена ДНК определяемого возбудителя, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если при выявлении ДНК микроорганизмов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (OK) и/или этапа ПЦР (K-) регистрируется сигнал по каналам для детекции этих микроорганизмов, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла по соответствующим каналам.
 3. Если для ДНК калибраторов ПЦР (UG1, UG2) значение порогового цикла по каналам FAM и/или JOE/HEX, ROX и Cy5 отсутствует, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
 4. Разница $C_t(UG2) - C_t(UG1)$ больше 10 ± 1 свидетельствует о сбое калибровки. Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. При повторном получении неудовлетворительного результата повторить ПЦР для всех проб и калибраторов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («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 – **«АмплиСенс-1»** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – Пороговый (**Ct**);
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец** (включая клинические образцы, ОК); **контроль+**, **контроль-**;
 - **Контроли** – положительные – 2 (калибраторы UG1, UG2); отрицательные – 1 (К-);
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл;
 - **Флуорофоры** – Fam; HEX; Rox, Cy5 – специфика.
 - 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**. (см. табл. 5):

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

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, Rox, Cy5	
	72	15 с	–	

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

Примечание – Канал **Су5.5** включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «МУЛЬТИПРАЙМ», для которых используется этот канал.

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать соответствующее название «АмплиСенс», указать количество образцов и 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** 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! 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 переворачивайте 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 **«АмплиСенс-1»**, 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. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК.

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**
 - **Критерии достоверности результата: поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 5 %**.
5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки Ф (отжать кнопку)**.
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии.

При необходимости поочередно для каналов **Fam, Hex, Rox, Cy5** установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного по графику образца ДНК-калибратора **UG1** в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для ДНК-калибратора **UG1** показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Скопировать результаты значений *Ct* для всех каналов в Excel из таблицы со значениями, либо нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат ***MS Word**, выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

Интерпретация результатов

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

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

Выражение конечного результата концентрации ДНК выявляемых возбудителей возможно в двух вариантах – в абсолютных и в относительных (нормированных) значениях.

В обоих случаях предварительно необходимо оценить концентрацию ДНК ВКО (Glob) в исследуемых образцах соскобного отделяемого слизистой оболочки влагалища соскобов из уретры и цервикального канала это значение должно превышать 10^3 и 10^2 геномных эквивалентов человека на реакцию для женщин и мужчин, соответственно.

ВНИМАНИЕ! В случае использования в качестве клинического материала-образцов мочи количество геномных эквивалентов человека на реакцию может быть менее 10^3 у женщин и менее 10^2 у мужчин.

Абсолютные значения концентрации возбудителя

Абсолютные значения концентраций ДНК выявляемых возбудителей отражают общее содержание микроорганизмов во взятом клиническом материале, помещенном в транспортную среду.

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК возбудителя

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток слизистой человека. Полученные значения количества геномных эквивалентов *возбудителя* нормируют на 100 тыс клеток человека. Кроме того, значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия клинического материала.

Расчеты проводятся с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel. Для этого необходимо скопировать данные *Ct* для всех каналов в шаблон расчета результатов, контрольные образцы и калибраторы назвать согласно инструкции к шаблону расчета результатов, нажать кнопку **Рассчитать**.

Возможные ошибки

1. Появление значения более 5 копий на реакцию (500 копий/мл) в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (ОК) и/или этапа ПЦР (К-) на канале Су5 свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, в которых обнаружена ДНК определяемого возбудителя, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если при выявлении ДНК микроорганизмов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (ОК) и/или этапа ПЦР (К-) регистрируется сигнал по каналам для детекции этих микроорганизмов, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла по соответствующим каналам.
3. Если для ДНК калибраторов ПЦР (UG1, UG2) значение порогового цикла по каналам Fam и/или Hex, Rox и Су5 отсутствует, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
4. Разница $Ct(UG2) - Ct(UG1)$ больше 10 ± 1 свидетельствует о сбое калибровки. Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. При повторном получении неудовлетворительного результата повторить ПЦР для всех проб и калибраторов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США)

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

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и 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. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Таблица 6

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для прибора CFX96

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	
	72	15 с	–	

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

Примечание – Канал **Quasar 705** включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «МУЛЬТИПРАЙМ», для которых используется этот

канал.

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

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, задать 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** используемые флуорофоры и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов, кроме ДНК-калибраторов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
Для ДНК-калибраторов **K1** и **K2** для всех каналов обозначить **Sample type – Standard** и указать их концентрацию в поле **Concentration** в соответствии с вкладышем к набору реагентов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и

усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

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

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. В соответствии со значениями C_t калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК

Поочередно для каналов **FAM, HEX, ROX, Cy5** установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер, выбрав в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по соответствующему каналу, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного по графику образца ДНК-калибратора **UG1** в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для ДНК-калибратора **UG1** показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Выражение конечного результата концентрации ДНК выявляемых возбудителей возможно в двух вариантах – в абсолютных и в относительных (нормированных) значениях.

В обоих случаях предварительно необходимо оценить концентрацию ДНК ВКО

(Glob) в исследуемых образцах соскобного отделяемого слизистой оболочки влагалища соскобов из уретры и цервикального канала это значение должно превышать 10^3 и 10^2 геномных эквивалентов человека на реакцию для женщин и мужчин, соответственно.

ВНИМАНИЕ! В случае использования в качестве клинического материала-образцов мочи количество геномных эквивалентов человека на реакцию может быть менее 10^3 у женщин и менее 10^2 у мужчин.

Абсолютные значения концентрации возбудителя

Абсолютные значения концентраций ДНК выявляемых возбудителей отражают общее содержание микроорганизмов во взятом клиническом материале, помещенном в транспортную среду.

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК возбудителя

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток слизистой человека. Полученные значения количества геномных эквивалентов *возбудителя* нормируют на 100 тыс клеток человека. Кроме того, значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия клинического материала.

Расчеты проводятся с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel. Для этого необходимо скопировать данные *Ct* для всех каналов в шаблон расчета результатов, контрольные образцы и калибраторы назвать согласно инструкции к шаблону расчета результатов, нажать кнопку **Рассчитать**.

Возможные ошибки

1. Появление значения более 5 копий на реакцию (500 копий/мл) в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (ОК) и/или этапа ПЦР (К-) на канале Су5 свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, в которых обнаружена ДНК определяемого возбудителя, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если при выявлении ДНК микроорганизмов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (ОК) и/или этапа ПЦР (К-) регистрируется сигнал по каналам для детекции этих микроорганизмов, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла по соответствующим каналам.

3. Если для ДНК калибраторов ПЦР (UG1, UG2) значение порогового цикла по каналам FAM и/или HEX, ROX и Cy5 отсутствует, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
4. Разница $Ct(UG2) - Ct(UG1)$ больше 10 ± 1 свидетельствует о сбое калибровки. Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. При повторном получении неудовлетворительного результата повторить ПЦР для всех проб и калибраторов.