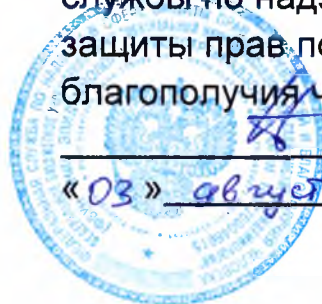


УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.Г. Акимкин

«03» августа 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения

ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого

канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,

56, 58, 59 типов в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FRT

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 2х.

Форма 2 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 4х.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 2х.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 4х.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами 3 и 4 гарантируются только в случае применения комплектов реагентов для экстракции ДНК «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2009), «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008), «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» (ТУ 9398-233-01897593-2015) производства Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реагент</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость*	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из 100 проб, включая контроли.

* При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 2х – комплект реагентов для ПЦР-амплификации и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39,

45, 51, 52, 56, 58, 59 типов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

<i>Реагент</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ А9	Прозрачная бесцветная жидкость	0,14	6 пробирок синяя крышка
ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ А7+	Прозрачная бесцветная жидкость	0,14	6 пробирок зеленая крышка
ПЦР-буфер-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,30	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	6 пробирок
К1 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К2 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К3 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 216 реакций амплификации (всего 108 тестов), включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец (ОКО) этапа выделения:

<i>Реагент</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 4х – комплект реагентов для ПЦР-амплификации и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

<i>Реагент</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ скрин-титр	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	3 пробирки
ПЦР-буфер-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,30	3 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	3 пробирки
К1 ВПЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К2 ВПЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К3 ВПЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 108 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа выделения:

<i>Реагент</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

К комплекту реагентов прилагается:

1. Диск, содержащий:

- программное обеспечение (в формате Microsoft® Excel) для обработки данных и получения результатов;
- шаблонный файл в формате ПО «Rotor-Gene» для быстрого запуска эксперимента;
- шаблонный файл в формате ПО «Mx3000P» для быстрого запуска эксперимента;
- файл программы амплификации для ПО «Rotor-Gene» и ПО «iQ iCycler»;
- инструкцию (в формате Microsoft® Word).

2. Инструкция на бумажном носителе.

3. Вкладыш со значениями калибраторов для данной серии набора реагентов.

НАЗНАЧЕНИЕ

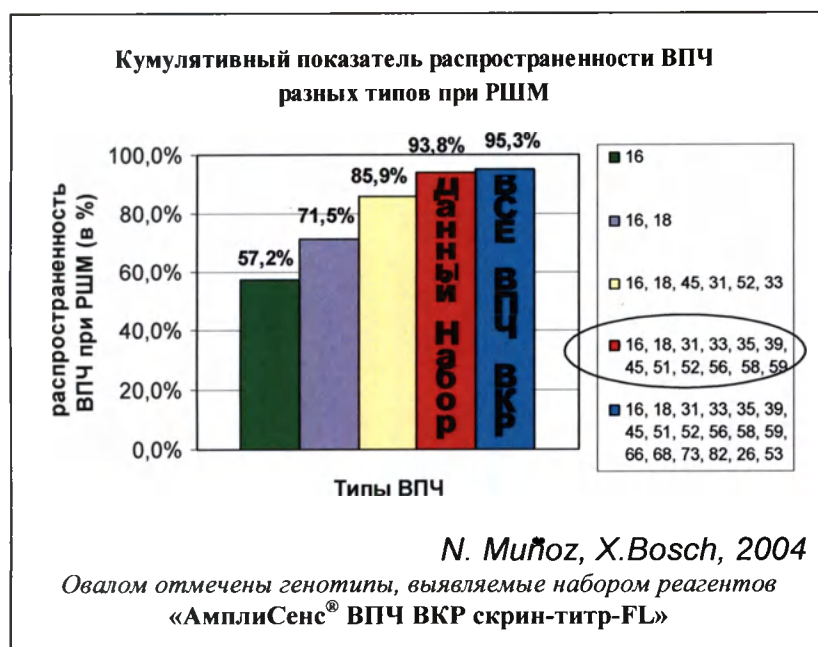
Набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» предназначен для выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Набор реагентов способен выявлять (без определения генотипа) ДНК ВПЧ двух основных филогенетических групп – А7, А9, которые включают следующие 10 типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59 – а так же ДНК ВПЧ 51 (группа А5) и 56 (группа А6) типов. Эти типы обладают высокой трансформирующей активностью и ответственны более чем за 94 % случаев тяжелых цервикальных дисплазий и рака шейки матки.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала, проведение ПЦР-амплификации и количественного определения ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения ПЦР-амплификации и количественного определения ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» для выделения ДНК из клинического материала производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

В наборе реагентов используется эндогенный внутренний контроль (участок β-

глобинового гена), а также технология горячего старта. Набор реагентов адаптирован для двухканальных приборов «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «iQ iCycler» («BioRad», США) с фильтрами для каналов FAM и HEX/JOE, «SmartCyclerII» («Cepheid», США), или четырехканальных приборов «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Mx3000P» («Stratagene», США), «iQ5» («BioRad», США). Возможно использование эквивалентного оборудования.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТЕСТА



Все установленные на сегодняшний день генотипы ВПЧ высокого канцерогенного риска (18 генотипов) ответственны за 95 % случаев рака шейки матки. Выявление небольшого числа генотипов (от 1 до 6) приводит к недостаточной диагностической чувствительности теста (86 %). Выявляемые данным набором реагентов 12 наиболее распространенных генотипов ВПЧ высокого канцерогенного

риска является достаточным для достижения высокой диагностической чувствительности 94 % при сохранении удобного формата исследования – в двух ПЦР-пробирках («ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 2x) или в одной ПЦР-пробирке («ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 4x).

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ТЕСТА

Диагностическая специфичность ВПЧ-теста определяется как способность метода не выявлять случаи латентной ВПЧ-инфекции, то есть без клинических признаков цервикальной дисплазии. В случае ВПЧ-теста диагностическая специфичность определяется выявлением только высокоонкогенных генотипов вируса и введением количественного порога клинической значимости инфекции.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПОДХОД К ДИАГНОСТИКЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

На сегодняшний день установлено, что нагрузка ДНК ВПЧ может отражать тяжесть и прогноз течения папилломавирусной инфекции. При правильном и стандартизированном заборе клинического материала вирусная нагрузка менее 10^5

копий ДНК ВПЧ ВКР в соскобе (Snijders, 2003) или 10^3 копий, приходящихся на 10^5 клеток человека, считается *клинически малозначимой*, так как практически не встречается при тяжелой дисплазии и РШМ, а так же ассоциирована с минимальным риском их развития. Напротив, количество вируса более 10^5 копий, приходящихся на 10^5 клеток при установленном факте персистентного течения инфекции (ВПЧ выявляется более 1 года) обозначается как *повышенная нагрузка ВПЧ*, что ассоциировано с повышенным риском развития тяжелой дисплазии и чаще встречается при РШМ. Наконец определенной информацией обладает мониторинг вирусной нагрузки. Так считается, что снижение количества ДНК ВПЧ более чем в 10 раз может являться маркером транзиторной инфекции. Рост вирусной нагрузки через 3, 6 и 9 мес после проведенного лечения свидетельствует о возможности рецидива.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) и детекции в режиме «реального времени» участков ДНК E1-E2 генов ВПЧ и участка ДНК β -глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК двенадцати типов ВПЧ проводится в двух пробирках («ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 2х), или в одной пробирке («ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT 4х).

В случае использования двухканальных приборов результат амплификации ДНК ВПЧ регистрируется по каналу флуоресценции JOE/Yellow/HEX/TET. В одной ПЦР-пробирке осуществляется регистрация генотипов, относящихся к филогенетической группе A9 (16, 31, 33, 35, 52, 58), в другой – генотипов из филогенетической ветви A7 (18, 39, 45, 59), а так же 51 и 56 генотипов.

В случае использования четырехканальных приборов результат амплификации ДНК ВПЧ каждой филогенетической группы регистрируется по отдельному каналу флуоресценции (A9 – JOE/Yellow, A7 – ROX/Orange, 51 и 56 типы по каналу Cy5/Red).

Пожалуйста, обратите внимание: выявление различных филогенетических групп в разных пробирках не является генотипированием вируса, так как каждая группа содержит несколько генотипов ВПЧ.

Результат амплификации внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце (цервикальный соскоб) в достаточном количестве, эквивалентном количеству клеток в мазке (10^3 – 10^5 копий ДНК человека или более 500 клеток). Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (выделение ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. В

случаях, если соскоб эпителия забран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток) сигнал амплификации β -глобинового гена будет заниженным.

Количественное определение ДНК ВПЧ основывается на существовании линейной зависимости между циклом начала увеличения флуоресценции образца (пороговый цикл, Cycle threshold, C_t) и исходной концентрацией ДНК-мишени. Для реализации количественного определения в реакцию амплификации параллельно берутся ДНК-калибраторы – образцы с известной концентрацией ДНК ВПЧ. По результатам амплификации ДНК-калибраторов выстраивается калибровочная прямая, по которой происходит определение концентрации ДНК ВПЧ в образцах. В данном наборе реагентов так же используется принцип *нормализации* количественного результата – соотношение полученной концентрации ДНК ВПЧ на количество эпителиальных клеток – с целью нивелировать эффект вариации при взятии материала.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Для проведения анализа используется следующий клинический материал:

У женщин: образцы эпителия забирают так же, как для цитологического исследования:

Первый способ – используется комплект для взятия образцов, содержащий одну/две цервикальные цитощетки и пробирку на 2 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в объеме 0,5 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый одной цервикальной цитощеткой, и/или соскоб эпителия с поверхности шейки матки (экзоцервикс), взятый второй цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощеток обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

Второй способ – используется комплект для взятия образцов фирмы «Digene» (США), содержащий цервикальную цитощетку и пробирку с транспортной средой «Digene» в объеме 1,0 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой «Digene».

Третий способ – используется комплект для взятия образцов, содержащий комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/экзоцервикса и пробирку на 5 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в объеме 2,0 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс) и поверхности шейки матки (экзоцервикс), поместить в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

Четвертый способ – используется комплект для взятия образцов, содержащий

комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/экзо-цервикса и банку с транспортно-фиксирующей средой фирмы «CytoScreen» (Италия) или фирмы «PreservCyt» (США) для жидкостной цитологии.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс) и поверхности шейки матки (экзоцервикс), поместить в пробирку с транспортно-фиксирующей средой. Рабочую часть зонда обломить и оставить в банке с транспортной средой.

У мужчин: соскоб эпителия уретры взятый универсальным зондом, поместить в пробирку на 2 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта мужчин» в объеме 0,5 мл.

Условия хранения проб:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 5 сут;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 20 сут;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение года. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

В транспортно-фиксирующей среде для жидкостной цитологии материал хранится при комнатной температуре в течение года.

Для обработки взятого клинического материала используются следующие комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- **«ДНК-сорб-АМ»** – для клинического материала, полученного первым, вторым и третьим способом. Так же для указанного материала допускается использование комплекта реагентов **«ДНК-сорб-В»** (ТУ 9398-003-01897593-2009);
- **«ДНК-сорб-С»** (ТУ 9398-075-01897593-2008) – для биоптатов слизистой;
- **«АмплиСенс® ДНК-сорб-Д»** (ТУ 9398-233-01897593-2015) – для обработки образцов жидкостной цитологии.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром². Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

² Для удаления надсадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,

- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1

Для выделения ДНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2

Для проведения ПЦР-амплификации и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:

1. Двухканальный амплификатор, например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «iQ iCycler» («BioRad», США) с фильтрами для каналов FAM и HEX/JOE, «SmartCyclerII» («Cepheid», США) или эквивалентный.
2. Четырехканальный амплификатор, например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Mx3000P» («Stratagene», США), «iQ5» («BioRad», США) или эквивалентный.
3. Для прибора «Rotor-Gene»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок или 0,1 мл («Corbett Research», Австралия) для постановки в ротор на 72 пробирки.

Для прибора «iQ iCycler»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка, стрипованные или нет) (например, «Ахуген», США), или 96-луночный планшет для ПЦР, снабженный термостабильными оптически прозрачными пленками (например, «BioRad», США).

Для прибора «Mx3000P»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка, стрипованные или нет) (например, «Ахуген», США) или плашки для ПЦР с оптически-прозрачными термостабильными клейкими пленками.

Для прибора «SmartCyclerII»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР для прибора «SmartCyclerII» на 25 мкл реакционной смеси («Cepheid», США). Центрифуга «MiniSpin» и штатив для пробирок («Cepheid», США).

4. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
8. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
9. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия), 0,1мл (например, «Corbett Research», Австралия).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
11. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
12. Емкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).

Объем пробы, необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.

Порядок работы

1. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть, перемешивая при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

2. Добавление реагентов.

Способ 1:

- отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения).
- ресуспендировать **сорбент универсальный** до гомогенной консистенции, внести в каждую пробирку по **20 мкл сорбента универсального** и по **300 мкл лизирующего раствора**, используя наконечники с аэрозольным барьером. Промаркировать пробирки.

Способ 2:

- перед началом работы во флакон с лизирующим раствором добавить весь объем (2 мл на 30 мл лизирующего раствора) предварительно гомогенизированного сорбента универсального и перемешать. Допускается хранение полученной смеси в течение 2 сут при комнатной температуре. Перед применением тщательно перемешать.
 - отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения) и, используя наконечник с аэрозольным барьером, внести в каждую пробирку по **320 мкл** подготовленной смеси **лизирующего раствора и сорбента универсального**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки согласно маркировке внести по **100 мкл** пробы, используя для каждой пробы отдельный наконечник с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**, используя наконечник с аэрозольным барьером.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и инкубировать **5 мин при температуре 65 °С** в термостате. После окончания инкубации перемешать на вортексе и поставить в штатив на **2 мин**.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при **10 тыс об/мин в течение 30 с**. Не захватывая сорбент универсальный, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без аэрозольного барьера.

6. Добавить в пробы по **1 мл отмывочного раствора**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального.
7. Повторить п. 5.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С** на **5-10 мин** для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
9. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Поместить в термостат с температурой **65 °С** на **5 мин**.
10. Перемешать на вортексе. Центрифугировать пробирки при **12 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (ДНК-проба). Указанный материал готов к постановке ПЦР.

ДНК-пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Пробирки с ДНК-пробами переносят в зону ПЦР-амплификации.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (TaqF-ДНК-полимераза), которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

Проведение амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант скрин-титр-FRT 2х

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР

1. Подготовить реакционную смесь (см. табл. 1 и 2) на необходимое количество реакций. При расчете следует учитывать, что каждая постановка реакции амплификации сопровождается постановкой как минимум четырех контрольных точек (**отрицательного контроля и трёх калибраторов**). Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше. Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
 - **7,0 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А9 или ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А7+;**
 - **7,5 мкл ПЦР-буфера-FRT;**
 - **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**

Способы внесения реактивов в пробирки

Для проведения исследования 14 образцов и постановки контролей	Для проведения исследования менее чем 14 образцов (например, N образцов) и постановки 8-ми контролей
- Отберите по одной пробирке с полимеразой (TaqF), ПЦР-буфером-FRT, ПЦР-смесью-1-FRT ВПЧ А9 и ПЦР-смесью-1-FRT ВПЧ А7+. - Добавьте все содержимое пробирки с полимеразой (TaqF) (20 мкл) в пробирку с ПЦР-буфером-FRT (300 мкл), аккуратно перемешайте на малых оборотах вортекса или встряхиванием (не допускайте образования пены) и отцентрифугируйте на вортексе в течение 1 с. - Добавьте по 160 мкл полученной смеси в пробирки с ПЦР-смесью-1-FRT ВПЧ А9 (140 мкл) и ПЦР-смесью-1-FRT ВПЧ А7+ (140 мкл).	- Смешайте в отдельной пробирке $15 \cdot (N+5)$ мкл ПЦР-буфера-FRT с $1,0 \cdot (N+5)$ мкл полимеразы (TaqF), аккуратно перемешайте на малых оборотах вортекса или встряхиванием (не допускайте образования пены) и отцентрифугируйте на вортексе в течение 1 с. - В две отдельные пробирки внесите по $7 \cdot (N+5)$ мкл ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А9 и ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А7+. - Половину $[8 \cdot (N+5)$ мкл] полученной смеси ПЦР-буфера-FRT с полимеразой (TaqF) внесите в аликвоту ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А9, вторую половину $[8 \cdot (N+5)$ мкл] – в аликвоту ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А7+. Для удобства расчетов см. табл. 2.
Полученные смеси аккуратно перемешайте на малых оборотах вортекса или встряхиванием (не допускайте образования пены) и отцентрифугируйте на вортексе в течение 1 с.	
Приготовьте 36 пробирок для ПЦР.	Приготовьте $[N \cdot 2 + 8]$ пробирок для ПЦР исходя из расчета по 2 пробирки на каждый клинический образец и 8 пробирок для контролей.

ВНИМАНИЕ! Смесь полимеразы (TaqF) и ПЦР-буфера-FRT хранить в течение 3 мес при температуре от 2 до 8 °С. Смеси полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-FRT и ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А9, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-FRT и ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А7+ должны быть использована в течение 2 ч после приготовления!

Таблица 2

Схема приготовления реакционных смесей для n исследуемых образцов, отрицательного контроля и трех калибраторов (N+3+1+1)

- Смешать в отдельной пробирке.

Количество образцов, N	1	2	3	4	5	6	7
ПЦР-буфер-FRT, мкл	90	105	120	135	150	165	180
Полимераза (TaqF), мкл	6	7	8	9	10	11	12
Количество образцов, N	8	9	10	11	12	13	14
ПЦР-буфер-FRT, мкл	195	210	225	240	255	270	Вся пробирка
Полимераза (TaqF), мкл	13	14	15	16	17	18	Вся пробирка

- Смешать в отдельной пробирке часть полученной смеси ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF) с ПЦР-смесью-1-FRT А9 (синяя крышка).

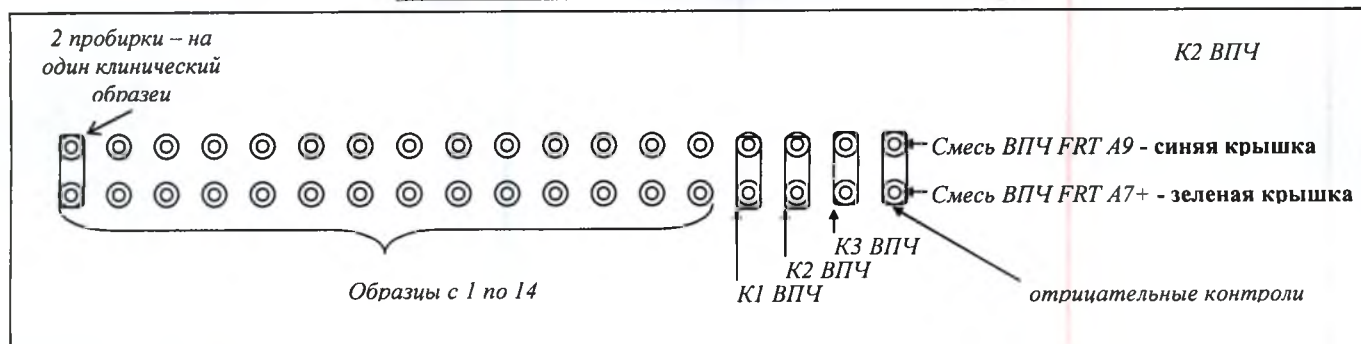
Количество образцов, N	1	2	3	4	5	6	7
смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	48	56	64	72	80	88	96
ПЦР-смесь-1-FRT A9, мкл (синяя крышка)	42	49	56	63	70	77	84
Количество образцов, N	8	9	10	11	12	13	14
смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	104	112	120	128	136	142	150
ПЦР-смесь-1-FRT A9, мкл (синяя крышка)	91	98	105	112	119	126	Вся пробирка

- Смешать в отдельной пробирке часть полученной смеси ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF) с ПЦР-смесью-1-FRT A7+ (зеленая крышка).

Количество образцов, N	1	2	3	4	5	6	7
смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	48	56	64	72	80	88	96
ПЦР-смесь-1-FRT A7+, мкл (зеленая крышка)	42	49	56	63	70	77	84
Количество образцов, N	8	9	10	11	12	13	14
смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	104	112	120	128	136	142	150
ПЦР-смесь-1-FRT A7+, мкл (зеленая крышка)	91	98	105	112	119	126	Вся пробирка

- В половину пробирок внесите по **15 мкл** приготовленной смеси ВПЧ FRT A9 в другую половину - приготовленной смеси ВПЧ FRT A7+.
- В готовые пробирки, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК. ДНК-пробы сначала добавлять в пробирку с приготовленной смесью ВПЧ FRT A9, потом в пробирку со смесью ВПЧ FRT A7+ (см. схему 1).
ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.
- Поставить контрольные и калибровочные реакции амплификации: (для каждой смеси):
 - отрицательный контроль (К–)** – вместо ДНК-пробы внести по **10 мкл ДНК-буфера** в пробирку с приготовленной смесью ВПЧ FRT A9, потом в пробирку со смесью ВПЧ FRT A7+;
 - калибраторы ВПЧ (К1, К2, К3)** – в три пробирки с приготовленной смесью ВПЧ FRT A9 внести по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора ВПЧ (**К1 ВПЧ, К2 ВПЧ, К3 ВПЧ**), в три пробирки с приготовленной смесью ВПЧ FRT A7+ внести по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора ВПЧ (**К1 ВПЧ, К2 ВПЧ, К3 ВПЧ**).

Размещение пробирок и внесение реагентов (только при использовании пробирок)



ВНИМАНИЕ! В случае если используется планшет для ПЦР (прибор «iQ iCycler») необходимо вносить образцы согласно порядку установки пробирок в прибор (см. приложение «Проведение амплификации и анализ результатов для прибора iQ iCycler»).

Б. Проведение реакции амплификации

1. Установите пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммируйте прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. приложения).
3. Анализ результатов осуществляется автоматически в программном обеспечении, соответствующем используемому оборудованию.

Принципы, лежащие в основе автоматического анализа данных:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов анализируются программой автоматического учета результатов. В соответствие с этими значениями автоматически происходит построение калибровочной прямой и расчет концентраций ДНК человека и ДНК ВПЧ. Конечный результат нормированной концентрации ДНК ВПЧ на количество клеток человека рассчитывается по формуле:

$$\lg \left[\frac{\text{число копий ДНК ВПЧ}}{\text{число копий ДНК человека}} \times 200000 \right] = \lg(\text{ВПЧ на } 100 \text{ тыс. клеток})$$

Для каждой серии набора реагентов существуют значения концентраций калибраторов. Эти значения указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов, и должны быть указаны в соответствующих ячейках программы автоматической интерпретации результатов.

Вся постановка считается **валидной** если:

- в отрицательных контролях сигнал отсутствует по всем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow/HEX/TET);
- во всех калибраторах выявляются сигналы по всем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow/HEX/TET).
- значение коэффициента корреляции калибровочных прямых для всех каналов не ниже 0,98.

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

Результат выявления ДНК ВПЧ данного образца считается:

Отрицательным, если в обеих пробирках для данного образца регистрируется сигнал внутреннего контроля (ВК) (канал FAM/Green) и при этом количество клеток человека на реакцию более 500.

Положительным, если регистрируется сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX/TET хотя бы в одной из двух пробирок. Результат:

- один или несколько типов из филогенетической группы A9 (если сигнал выявлен в пробирке со смесью ВПЧ FRT A9);
- один или несколько типов из филогенетической группы A7 или 51/56 типы (если сигнал выявлен в пробирке со смесью ВПЧ FRT A7+).

Невалидным,

- если ни в одной из 2-х пробирок не регистрируется положительных сигналов по каналам (JOE/Yellow/HEX/TET) (A9, A7, A5/A6), а сигнал внутреннего контроля (FAM/Green) не регистрируется или количество клеток человека на реакцию не превышает 500.
- в образце регистрируется слабopоложительный(ые) сигнал(ы) по каналу JOE/Yellow/HEX/TET, однако сигнал внутреннего контроля (FAM/Green) не регистрируется или количество клеток на реакцию не превышает 500.

ВНИМАНИЕ! Невалидный результат требует повторного исследования образца, начиная с этапа выделения ДНК или взятие материала.

Проведение амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант скрин-титр-FRT 4х

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (0,02 мл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-буфером-FRT (0,3 мл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси. Для смешивания реагентов использовать только стерильные наконечники с аэрозольным барьером.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на проведение 40 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

2. Поставить в штатив необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип микропробирок зависит от используемого прибора.
3. Внести реактивы в пробирки (см. табл. 3).

Таблица 3

Способы внесения реактивов в пробирки

<i>Первый способ – экономный</i>	<i>Второй способ</i>
1. Раскапать в микропробирки по 7 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ скрин-титр 2. Раскапать сверху по 8 мкл приготовленной смеси ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF)	1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций - смешайте в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ скрин-титр и приготовленную смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF) из расчета на <u>каждую</u> реакцию: – 7 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ скрин-титр; – 8 мкл смеси ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF). При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается постановкой как минимум четырех контрольных точек (отрицательного контроля и трёх калибраторов). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше (см. табл. 4). 2. Раскапать приготовленную смесь в микропробирки по 15 мкл.

ВНИМАНИЕ! Смесь полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-FRT и ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ скрин-титр должна быть использована в течение 2 ч после приготовления!

Схема приготовления реакционных смесей для n исследуемых образцов, отрицательного контроля и трех калибраторов (n+3+1+1)

Необходимо исследовать образцов:	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ скрин-титр, мкл	56	63	70	77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154
смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	64	72	80	88	96	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176
Необходимо исследовать образцов:	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ скрин-титр, мкл	161	168	175	182	189	196	203	210	217	224	231	238	245	252	259
смесь ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	184	192	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280	288	296

4. В готовые пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из клинических проб.
- ВНИМАНИЕ!** При добавлении ДНК-проб необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.
5. Поставить контрольные и калибровочные реакции амплификации:
- а) отрицательный контроль (К-) – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
 - б) калибраторы ВПЧ (К1, К2, К3) – в три пробирки внести по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора ВПЧ (К1 ВПЧ, К2 ВПЧ, К3 ВПЧ).

Б. Проведение реакции амплификации

- 1. Установить пробирки в реакционный модуль.
- 2. Запрограммируйте прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. приложения).
- 3. Анализ результатов осуществляется автоматически в программном обеспечении, соответствующем используемому оборудованию.

Принципы, лежащие в основе автоматического анализа данных:

Сигнал в данной пробирке по данному каналу считается положительным, если соответствующая кривая накопления флуоресценции пересекает линию порога. Характеристикой данного сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения флуоресцентной кривой и линии порога. Именно значения пороговых циклов анализируются программой автоматического учета результатов. В соответствие с этими значениями автоматически происходит

построение калибровочной прямой и расчет концентраций ДНК человека и ДНК ВПЧ. Конечный результат нормированной концентрации ДНК ВПЧ на количество клеток человека рассчитывается по формуле:

$$\lg \left[\frac{\text{число копий ДНК ВПЧ}}{\text{число копий ДНК человека}} \times 200000 \right] = \lg(\text{ВПЧ на 100 тыс. клеток})$$

Для каждой серии набора реагентов существуют значения концентраций калибраторов. Эти значения указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов, и должны быть указаны в соответствующих ячейках программы автоматической интерпретации результатов.

Вся постановка считается **валидной**, если:

- в отрицательных контролях сигнал отсутствует по всем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red);
- во всех калибраторах выявляются сигналы по всем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red);
- значение коэффициента корреляции калибровочных прямых для всех каналов не ниже 0,98.

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

Результат выявления ДНК ВПЧ данного образца считается:

Отрицательным, если в образце регистрируется сигнал внутреннего контроля (ВК) (канал FAM/Green) и при этом количество клеток человека на реакцию более 500.

Положительным, если:

- регистрируется сигнал по каналу JOE/Yellow – результат: один или несколько типов из филогенетической группы A9 (16, 31, 33, 35, 52, 58);
- регистрируется сигнал по каналу ROX/Orange – результат: один или несколько типов из филогенетической группы A7 (18, 39, 45, 59);
- регистрируется сигнал по каналу Cy5/Red – результат: 51 и/или 56 тип(ы) (филогенетические ветви A5 и A6).

Невалидным, если в образце не регистрируется положительных сигналов по каналам (JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red) (A9, A7, A5/A6), а сигнал внутреннего контроля (FAM/Green) не регистрируется или количество клеток человека на реакцию не превышает 500.

ВНИМАНИЕ! Невалидный результат требует повторного исследования образца, начиная с этапа выделения ДНК или взятия материала.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» (кроме полимеразы (TaqF), ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ скрин-титр, ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А9 и ПЦР-смеси-1-FRT ВПЧ А7+) хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ скрин-титр, ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ А9, ПЦР-смесь-1-FRT ВПЧ А7+ и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество комплекта реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru³.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации

Е.В. Ржевская

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Код партии



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Температурный диапазон



Изготовитель



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изготовления

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ ДВУХКАНАЛЬНОГО ПРИБОРА «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

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

Проведение реакции амплификации

1. Включите прибор, запустите программу RotorGene.
2. Для дальнейшей автоматической обработки результатов выберете один из вариантов установки пробирок в барабан прибора:
 - Установите последовательно начиная с первой ячейки все пробирки со смесью ВПЧ FRT A9, затем, не меняя порядка все пробирки со смесью ВПЧ FRT A7+; **ВНИМАНИЕ!** Если вы проводите исследование менее чем 14 образцов (неполная загрузка карусели), то необходимо выставлять пробирки со смесью ВПЧ FRT A9 начиная с 19 ячейки барабана для адекватной интерпретации результатов реакции.
 - Установите пробирки попарно: смесь ВПЧ FRT A9 и смесь ВПЧ FRT A7+ для первого образца, смесь ВПЧ FRT A9 и смесь ВПЧ FRT A7+ для второго образца и т.д., ... смесь ВПЧ FRT A9 и смесь ВПЧ FRT A7 для калибратора K1, смесь ВПЧ FRT A9 и смесь ВПЧ FRT A7+ для калибратора K2, смесь ВПЧ FRT A9 и смесь ВПЧ FRT 7+ для калибратора K3, смесь ВПЧ FRT A9 и смесь ВПЧ FRT A7+ для отрицательного контроля амплификации K-.

ВНИМАНИЕ! Если вы не полностью заполняете карусель прибора, то ее следует уравновесить. Для этого заполните незанятые места пустыми пробирками (*не используйте пробирки от предыдущих экспериментов*). Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Установите карусель в прибор, закройте крышку.
4. Запустите программу амплификации. Для этого используйте один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для запуска программы амплификации

ВНИМАНИЕ! Для проведения амплификации настоятельно рекомендуется использование прилагаемого к комплекту реагентов шаблонного файла «*AmpliSens FRT HR HPV Screen RG2x.ret*».

Для использования шаблона для данного набора реагентов необходимо предварительно скопировать прилагающийся к комплекту файл «*AmpliSens FRT HR HPV Screen RG2x.ret*» в папку «Templates» папки программы «RotorGene». При установке «Rotor-Gene» по умолчанию путь к указанной папке следующий: «C:\Program Files\RotorGene 6\Templates» - для прибора «Rotor-Gene» 3000 и «C:\Program Files\RotorGene 6000 Software\Templates» - для прибора «Rotor-Gene» 6000. После выполнения этой процедуры в окне «New Run»/«Новый тест» (вызывается кнопкой «New»/«Новый» панели инструментов) появится пункт «*AmpliSens FRT HR HPV Screen RG2x*». Его и следует выбирать для запуска нового эксперимента.

Примечание: шаблонный файл можно открыть из другой папки. Для этого в окне «New Run»/«Новый тест» выберите вкладку «Advanced»/«Детальный мастер» и в ней пункт «Open A Template In Another Folder...»/«Открыть шаблон из другой папки...», далее перейдите в папку, содержащую файл «*AmpliSens FRT HR HPV Screen RG2x.ret*» и откройте его.

В шаблонном файле уже заданы все необходимые параметры амплификации, поэтому необходимо только внести данные об эксперименте и расшифровку образцов.

Самостоятельное программирование

- Запустите мастер нового эксперимента в режиме «Advanced»/«Детальный мастер»;
- В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси *Reaction volume/Объем реакции (µL)* равный **25**. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 так же необходимо установить галочку напротив параметра **15 µL oil layer volume/15 µL объем масла/воска**;
- Задайте программу амплификации (см. табл. 5);

Таблица 5

**Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов**

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	—	1
Hold2/Удерж. темп-ры2	65	2 мин	—	1
Cycling/ Циклирование	95	20 с	—	5
	64 Touchdown: 1 deg. per cycle / Снижать темп-ру шага на 1 град. каждый цикл	25 с	—	
	65	55 с	—	
	95	15 с	—	
Cycling2/Циклирование2	60	25 с	—	40
	65	40 с	FAM/Green, JOE/Yellow	

Примечание. Для задания программы амплификации можно воспользоваться прилагаемым к комплекту реагентов файлом в формате ПО «RotorGene» (AmpliSens FRT HR HPV Screen-titr RG2x Program.pro).

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать **универсальную программу** амплификации и детекции **«АмплиСенс-1 RG»** (см. табл. 6). С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП). Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

Таблица 6

Программа амплификации «АмплиСенс-1 RG»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Hold/Удерж.темпер-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
	95	5 с	–	
Cycling2/Циклирование2	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	40
	72	15 с	–	

Примечание. Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

- Задайте параметры калибровки «Calibrate»/«Gain Optimisation»/«Опт.уровня сигн.» в «Advanced»/«Детальный мастер» – мастере нового эксперимента):
 - а) осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых»);
 - б) калибровать перед первым измерением («Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции»);
 - в) установка калибровки канала для всех красителей от 4FI до 8FI (кнопка «Edit...»/«Правка...», окно «Auto gain calibration channel settings»/«Авто-оптимизация уровня сигнала»).

3. Запустите амплификацию, выбрав кнопку «Start run»/«Старт» и присвоив имя файлу эксперимента.

4. Внесите данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке «Name»/«Имя» укажите названия/номера исследуемых клинических образцов. Так как для анализа образца используется две пробирки, то для правильной автоматической интерпретации результатов присвойте обеим пробиркам, соответствующим данному образцу одинаковое имя. Напротив всех исследуемых образцов, включая контрольные, установите тип «Unknown»/«Образец». Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам установите тип «None»/«Пусто». Калибраторы назовите «K1», «K2», «K3», отрицательный контроль – «K-».

ВНИМАНИЕ! При установке типа «None»/«Пусто» данные образца не анализируются.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Оценка данных

Просмотрите необработанные данные прибора по двум каналам (FAM/Green, JOE/Yellow) выбирая кнопки «Cycling A...» на панели «Channels»/«Каналы». Обратите внимание на следующие моменты:

- среди всех сигналов образцов по каналу должен быть хотя бы один положительный (положительный сигнал имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции см. рис. 1). При правильной постановке и течении эксперимента обязательно должны присутствовать сигналы калибраторов K1, K2, K3.

ВНИМАНИЕ! При полном отсутствии положительных сигналов по флуоресцентному каналу обработка данных канала может дать некорректный результат.

- наличие образцов с фоновым сигналом, резко отличающимся от большинства свидетельствует об ошибке при внесении в пробирку реакционной смеси или образца ДНК (см. рис. 2б и раздел «Возможные проблемы и ошибки»).

Допускается разница в фоновых сигналах смесей ВПЧ FRT A9 и ВПЧ FRT A7+

Обработка данных

1. Удостоверьтесь, что все анализируемые образцы активны в легенде справа.
2. Запустите функцию «Analysis»/«Анализ», выберите вкладку «Quantitation»/«Количественный» и в ней канал FAM/Green, затем кнопку «Show»/«Показать».
3. После открытия окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» вручную установите пороговый цикл: Threshold/Порог = 0,03.
4. Выберите линейный тип шкалы («Linear scale»/«Линейная шкала»), активируйте параметры «Dynamic tube»/«Динамич.фон», «Slope Correct»/«Коррект.уклона».
5. Выберите параметр «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» и установите значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона - ПФ) равным 15 %.

ВНИМАНИЕ! Достаточно редко из-за нисходящего характера кривых в начале

эксперимента возможно явление пересечения линии порога (Threshold/Порог) и кривых флуоресценции на первых циклах, при этом программа RotorGene может засчитывать данные пересечения за положительный сигнал (рис. 7). Для устранения эффекта воспользуйтесь функцией «Eliminate cycles before...»/«Исключить циклы до...», задав значение 5, проигнорировав тем самым пересечение порога и кривой флуоресценции на первых пяти циклах.

6. В таблице результатов («Quant. Results»/«Количественные результаты»): выделите колонку «Name»/«Имя» однократно щелкнув мышью на заголовке. Скопируйте колонку, выбрав «Сору»/«Копировать» из контекстного меню (вызывается правой кнопкой мыши) (рис. 9).

7. Откройте прилагающийся к комплекту реагентов файл Microsoft® Excel «AmpliSens FRT HR HPV Screen RG2x Results Matrix.xls», 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 выберите в меню пункт «Сервис»>«Макрос»>«Безопасность...» и установите средний уровень безопасности.

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».

8. Установите курсор на ячейку «Name» столбца «Обозначение образца» таблицы «Данные прибора» и выберите «Вставить» из контекстного меню (рис. 10).

9. Аналогично выберите и скопируйте колонку «Ct» из таблицы результатов («Quant.Results»/«Количественные результаты»). Установите курсор в таблице Excel в ячейку «Ct» под названием флуоресцентного красителя FAM/Green.

10.Повторите процедуру флуоресцентного красителя JOE/Yellow.

11.Установите режим «Количественный анализ», внутренняя калибровка.

12.Внесите данные концентраций калибраторов в таблицу «Знач. калибр.» в соответствие с вкладышем к данной серии набора реагентов.

13.В столбце «Обозначение» проверьте, что калибратор K1 имеет имя «K1», калибратор K2 имеет имя «K2», калибратор K3 имеет имя «K3» (без пробела между буквой K и цифрой), отрицательный контроль – «K-» или «-»

14.Сохраните файл Microsoft® Excel под другим именем.

Анализ данных

Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажмите кнопку **результаты**. В колонке «результаты» появятся выявленные в образцах филогенетические группы ВПЧ, а так же результат: положительный (pos), отрицательный (neg), слабopоложительный (weak), невалидный (NV).

Далее в таблице отображается количество клеток человека на реакцию, используется для оценки валидности образца. Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в lg на 10⁵ клеток по группам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии со следующим:

Результат lg (копий ДНК ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

Для корректной обработки данных программой необходимо в колонке «Name»:

- обозначить пробирки с разными смесями, но соответствующие одному образцу одинаковым именем;
- обозначить положительные контроли как «+» или «K+», а отрицательные контроли как «-» или «K-».

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

Перед использованием набора реагентов рекомендуется изучить этот раздел.

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

Возможные Проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
		коэффициента умножения gain в разных экспериментах более чем на 2 единицы (<i>при использовании <u>одного и того же прибора</u></i>). ВНИМАНИЕ! эффект увеличения множителя gain может также наблюдаться после очистки линз прибора от сильного загрязнения	
Снижение чувствительности из-за снижения активности TaqF-полимеразы	Неправильное хранение полимеразы или нарушение условий стерильности приводит к разрушению фермента	Выявляется по отсутствию сигнала положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля выше порога слабых образцов	Использовать адекватно хранящийся (см. <i>Хранение</i>) или новый фермент.

Примечание. Информацию по всем установленным параметрам эксперимента, а так же отчет по автокалибровке можно найти, просмотрев установки эксперимента (кнопка «Settings»/«Установки»). В частности, вкладка «Messages»/«Сообщения» пункт **«Autocalibration Log Messages» - отчет об автокалибровке - отчет об автокалибровке.**

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых) (<i>рис. 2б</i>). Образец отрицательный.	Повторное исследование образца, начиная с этапа ПЦР
В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси <i>или</i> внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых) (<i>рис. 2б</i>).	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование, начиная с этапа ПЦР
Не задан параметр автокалибровки от 4FI до 8FI или ошибка в первой пробирке барабана (ее отсутствие, неправильное внесение образца ДНК или реакционной смеси)	Большинство фоновых сигналов флуоресценции меньше 1 или больше 20	Задать параметр при следующем запуске. Если произошел «зашкал» или сигналы очень слабые (при обработке нет положительных сигналов, фон меньше 0,5) необходим повтор исследования начиная с этапа ПЦР.
При приготовлении смеси реагентов не внесена TaqF-полимераза	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями (начиная с этапа ПЦР)

ПРИЛОЖЕНИЕ. РИСУНКИ

I. Необработанные данные

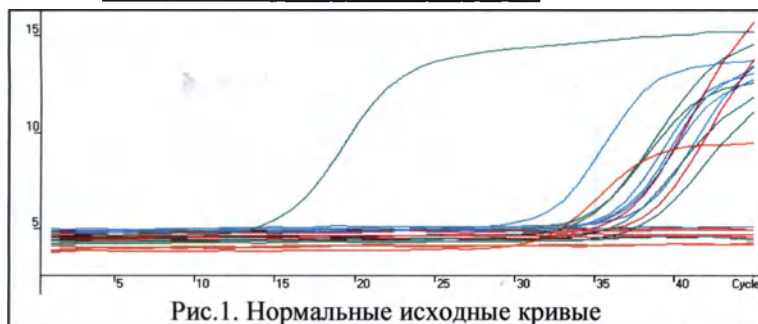


Рис.1. Нормальные исходные кривые

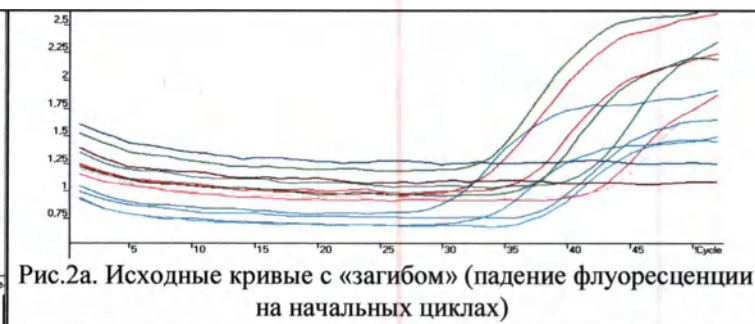


Рис.2а. Исходные кривые с «загибом» (падение флуоресценции на начальных циклах)

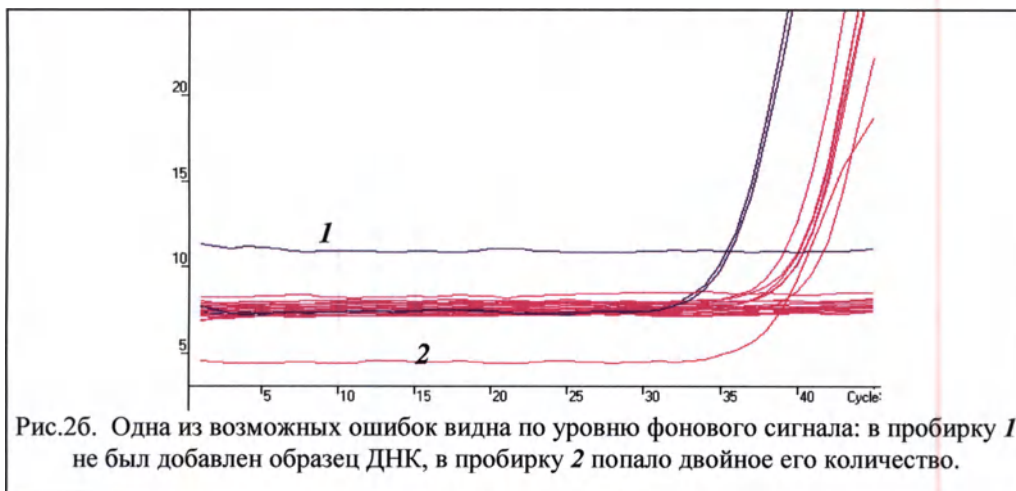


Рис.2б. Одна из возможных ошибок видна по уровню фонового сигнала: в пробирку 1 не был добавлен образец ДНК, в пробирку 2 попало двойное его количество.

II. Обработанные данные

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

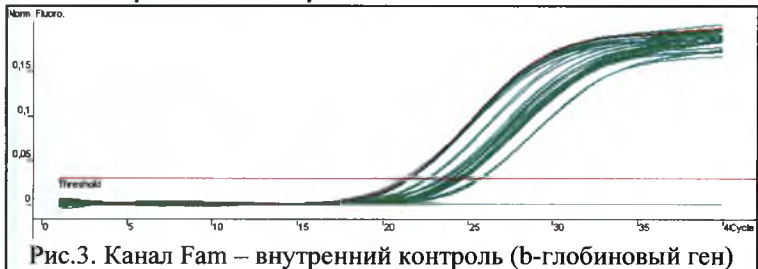


Рис.3. Канал Fam – внутренний контроль (b-глобиновый ген)

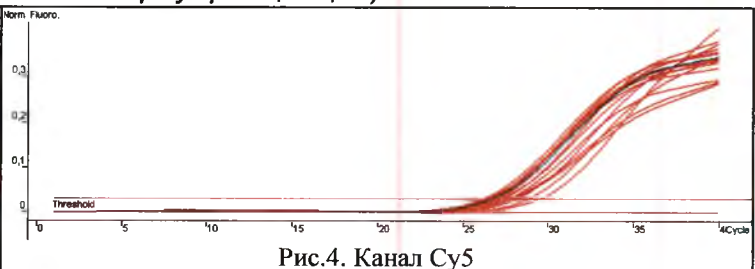


Рис.4. Канал Cy5

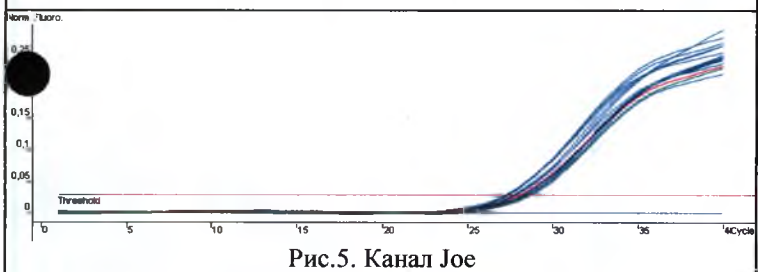


Рис.5. Канал Joe

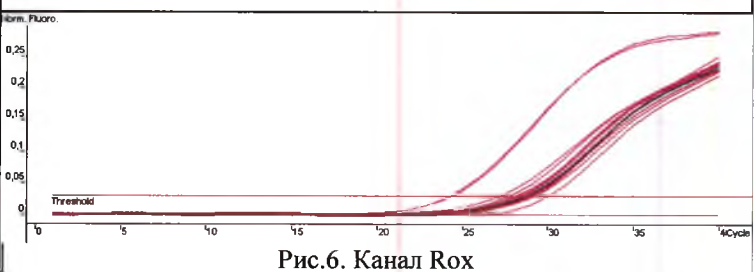


Рис.6. Канал Rox

б) неправильная обработка кривых



Рис.7. Линия порога пересекает кривые флуоресценции дважды

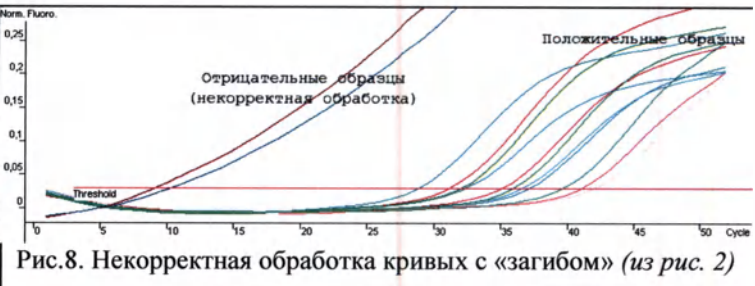


Рис.8. Некорректная обработка кривых с «загибом» (из рис. 2)

III. Анализ результатов

Quant. Results - Cycling A..JOE...

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

Рис.9. таблица результатов «Quant.Results»

Дата:

Описание:

Обозначить парные неподписанные как пустые

Обозначить

Порог слабых образцов, Ct

BK	HPV A9	HPV A7+
25	33	32

Последовательность установки пробирок в прибор

последовательно все пробирки со смесью A9, затем все со смесью A7+

Данные прибора

№№	Обозначение образца	Fam (BK)	Joe (HPV)
	Name	Ct	Ct
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			

Результаты обсчета

№№	Обозначение образца	Результаты		
		ветвь A9	ветвь A7, 51, 56	общий
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*

Рис.10. программа «AmpliSens FRT HR HPV Screen RG2x Results Matrix.xls»

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ ПРИБОРА «iQ iCycler» («BioRad», США)

Проведение реакции амплификации

1. Включите прибор, запустите программу «iQ iCycler».
2. Задайте схему планшета – схему расположения пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам FAM и HEX в модуле Plate Setup. Сохраните.
3. Поместите в модуль в соответствии с заданной схемой экспериментальные пробирки.
4. Запустите на амплификаторе «iQ iCycler» программу «AmpliSens FRT HR HPV Screen iQ» (выбрав или создав эту программу в модуле View Protocols) с заданной схемой планшета (см. табл. 7).

ВНИМАНИЕ! Для задания программы амплификации рекомендуется использовать прилагаемый к комплекту файл «*AmpliSens FRT HR HPV Screen iQ.tmo*». Для его использования перейдите в раздел «Library» на вкладку «View Protocol» и далее перейдите в папку, содержащую указанный файл, однократно щелкните на имени файла для его активации.

Таблица 7

**Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов**

Этап	Температура	Время	Измерение флуор.	Повторов
1	95 °C	15 мин	—	1
2	65 °C	2 мин	—	1
3	95 °C	20 с	—	5
	64 °C Temp -; 1.0 на цикл	25 с	—	
	65 °C	55 с	—	
4	95 °C	20 с	—	42
	60 °C	25 с	—	
	65 °C	55 с	FAM, HEX	

Примечание. Если прибор не откалиброван по каналу HEX, возможно использование канала JOE.

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1 iQ» (см. табл. 8). С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП). Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

Таблица 8

Программа амплификации «АмплиСенс-1 iQ»

Этап	Температура	Время	Измерение флуор.	Повторов
1	95 °C	15 мин	–	1
2	95 °C	5 с	–	5
	60 °C	20 с	–	
	72 °C	15 с	–	
3	95 °C	5 с	–	40
	60 °C	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72 °C	15 с	–	

Примечание. Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

5. Перед запуском выполнения программы в окне модуля «Run-Time Central» задайте измерение факторов лунок по исследуемым пробиркам – под строкой «Select well factor source» выберите вариант «Experimental Plate». Используется стандартная программа для определения внутреннего фактора лунок (файл dynamicwf.tmo: 95 °C - 30с далее 2 цикла с измерением флуоресценции: 95 °C -30с).

Установка пробирок в прибор.

Для дальнейшей автоматической обработки результатов выберите один из следующих способов установки пробирок в прибор:

- Вариант 1: Установите в прибор пару пробирок, соответствующих одному клиническому образцу: сначала со смесью ВПЧ FRT **A9** затем ВПЧ FRT **A7+**. Затем пару, соответствующую следующему образцу и т.д.
- Вариант 2 (обратный): Установите в прибор пару пробирок, соответствующих одному клиническому образцу: сначала со смесью ВПЧ FRT **A7+** затем ВПЧ FRT **A9**. Затем пару, соответствующую следующему образцу и т.д.

Пары пробирок устанавливаются по горизонтали слева направо.

При установке пробирок желательно не использовать краевые лунки, т.е. установку пробирок начинать со второй лунки во втором ряду и заканчивать предпоследней лункой в предпоследнем ряду. При этом, однако, в одной постановке будет участвовать не более 60 пробирок.

Схема 2



6. После установки пробирок закройте крышку прибора и нажмите кнопку «Begin Run», задайте имя файла результатов.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Оценка данных

Желательно после прохождения эксперимента просматривать необработанные данные прибора по двум каналам (FAM, HEX/JOE). Для этого выберите отображение информации по одному из каналов (окно «Select a Reporter»), после чего установите режим отображения («Select Analysis Mode»): «Background subtracted».

Среди всех сигналов образцов по каналу должен быть хотя бы один положительный (положительный сигнал имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции). При правильной постановке и течении эксперимента обязательно должен присутствовать сигнал положительного контроля.

При полном отсутствии положительных сигналов по флуоресцентному каналу обработка данных канала может дать некорректный результат.

Обработка данных

Вернитесь к режиму отображения данных «PCR Base Line Subtracted Curve Fit».

1. Удостоверьтесь, что все анализируемые образцы отображаются. (В окне «Select Wells» изображение всех анализируемых лунок должно быть синим).
2. В модуле «Select Reporter» выберите канал Fam-490.
3. В модуле «Threshold Cycle Calculations» задайте параметр Baseline cycle «User defined», Baseline cycles «2» through «10». Обычно до задания этого параметра кривые флуоресценции по каналу FAM отображаются не вполне корректно, что

- выражается в «опрокидывании» кривых флуоресценции (начальный и конечный участки довольно сильно нисходящие, а не горизонтальные, см. рис. 5).
4. Задайте автоматический выбор порога Threshold Position – Auto Calculated. В случае если при автоматическом выборе порога, пороговая линия оказывается слишком высоко (на уровне выхода флуоресцентных кривых на плато) необходимо задать режим Threshold Position – User Defined и установить линию порога на высоте 1/3 между базовой линией и уровнем выхода кривых на плато (см. рис 3).
 5. В таблице результатов, однократно щелкнув по заголовку, выделите колонку «Threshold Cycle Ct». Скопируйте колонку, нажав комбинацию клавиш «Ctrl+C».
 6. Откройте прилагающийся к комплекту реагентов файл Microsoft® Excel «AmpliSens FRT HR HPV Screen iQ Results Matrix.xls», 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 выберите в меню пункт «Сервис»>«Макрос»>«Безопасность...» и установите средний уровень безопасности.
 7. Установите курсор на ячейку «Ct» под названием флуоресцентного красителя FAM таблицы «Данные прибора» и выберите «Вставить» из контекстного меню.
 8. Далее аналогично щелкнув по заголовку «Identifier» и нажав Ctrl+C (в программе iQ iCycler) установите курсор на ячейку «Identifier» столбца «Обозначение образца» таблицы «Данные прибора» и выберите «Вставить» из контекстного меню.
 9. В модуле «Select Reporter» выберите канал Hex-530/Joe-530.
 10. Обычно автоматический выбор базовой линии проходит правильно, потому кривые не «заваливаются». Если же все же это произошло, то в модуле «Threshold Cycle Calculations» задайте параметр Baseline cycle «User defined», Baseline cycles «2» through «10».
 11. Задайте автоматический выбор порога Threshold Position – Auto Calculated.
 12. Аналогично выберите и скопируйте колонку «Threshold Cycle Ct» из таблицы результатов. Установите курсор в таблице Excel в ячейку «Ct» под названием красителя HEX.
 13. В выпадающем списке «Последовательность установки пробирок в прибор» выберите Ваш способ установки пробирок (см. пункт «Установка пробирок»).
 14. Внесите данные порогов слабых образцов в соответствии с вкладышем к данной серии комплекта реагентов.
 15. Сохраните файл Microsoft® Excel под другим именем.

Анализ данных

Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажмите кнопку результаты. В колонке «результаты» появятся выявленные в образцах филогенетические группы ВПЧ, а так же результат: положительный (pos), отрицательный (neg), слабopоложительный (weak), невалидный (NV).

Для корректной обработки данных программой необходимо в колонке «Обозначение образца» («Identifier»):

- обозначить пробирки с разными смесями, но соответствующие одному образцу одинаковым именем или обозначить только одну из пробирок, имя второй оставив пустым.
- обозначить положительные контроли как «+» или «K+», а отрицательные контроли как «-» или «K-».

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

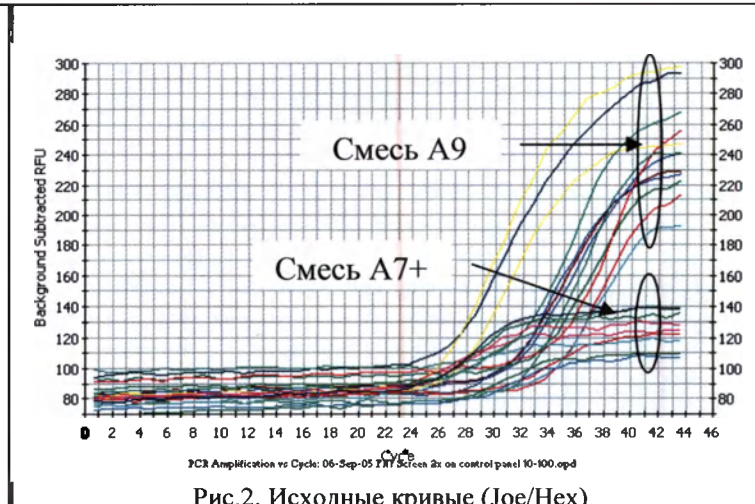
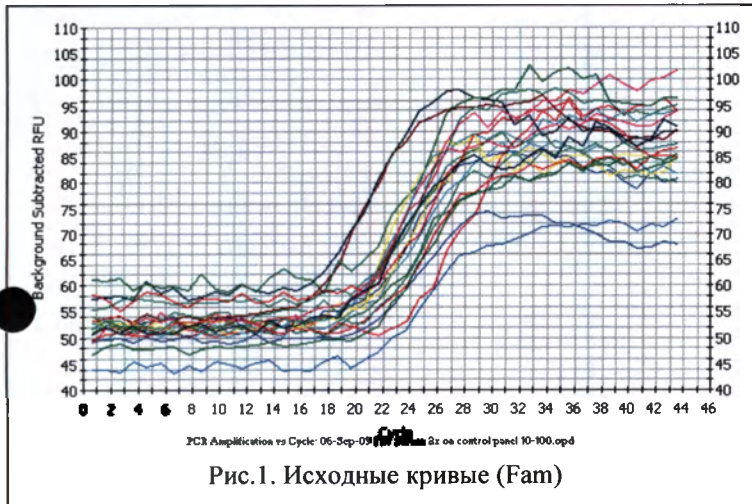
Перед использованием комплекта рекомендуется изучить этот раздел.

Возможные Проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Обработанные кривые флуоресценции (режим <i>PCR Base Line Subtracted Curve Fit</i>) «заваливаются» - см. рис. 5	Неправильная математическая обработка экспериментальных данных программой iQ iCycler.	См. рис 5, начальный и конечный участки являются довольно сильно нисходящими, а не горизонтальными	В модуле «Threshold Cycle Calculations» задайте параметр Baseline cycle «User defined» и для расчета: Baseline cycles «2» through «10».
Снижение чувствительности из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов комплекта (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в загрязненных условиях) могут приводить к разрушению олигонуклеотидов	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами <u>той же серии</u> . Выявляется по увеличению значения фоновой флуоресценции (флуоресценция в начале эксперимента, оценивается в режиме Background subtracted) в разных экспериментах более чем в 3 раза (<u>при использовании одного и того же прибора и одинаково приготовленных растворов для расчета факторов лунок</u>). ВНИМАНИЕ! эффект увеличения флуоресценции может также наблюдаться после очистки оптической системы прибора	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. <i>Хранение</i>)
Снижение чувствительности из-за снижения активности TaqF-полимеразы	Неправильное хранение полимеразы или нарушение условий стерильности приводит к разрушению фермента	Выявляется по отсутствию сигнала положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля выше порога слабых образцов	Использовать адекватно хранящийся (см. <i>Хранение</i>) или новый фермент.

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, начиная с этапа ПЦР, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
При приготовлении смеси реагентов не внесена TaqF-полимераза	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование, с правильно приготовленными смесями начиная с этапа ПЦР

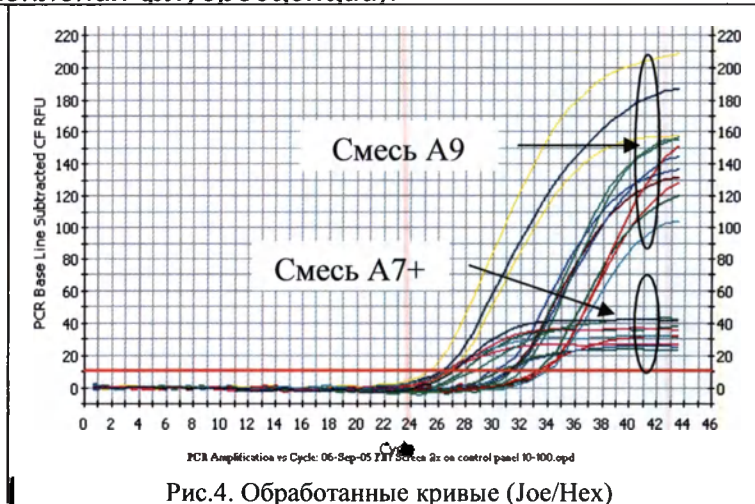
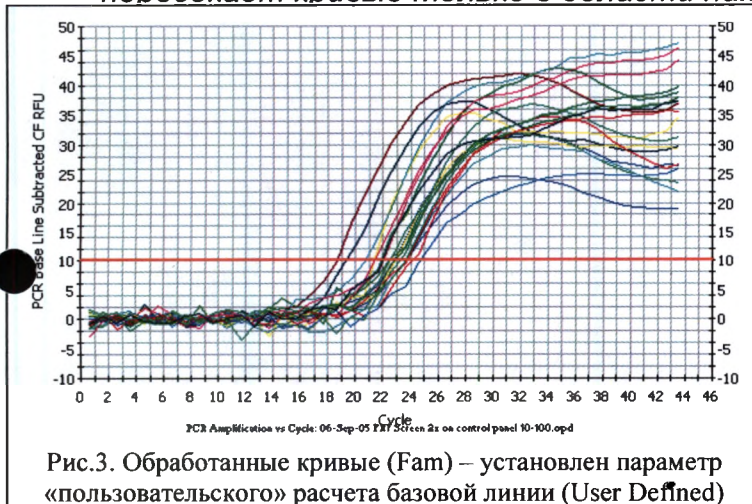
ПРИЛОЖЕНИЕ. РИСУНКИ

I. Необработанные данные (режим Background subtracted).



II. Обработанные данные (режим PCR Base Line Subtracted Curve Fit)

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



б) неправильная обработка кривых.

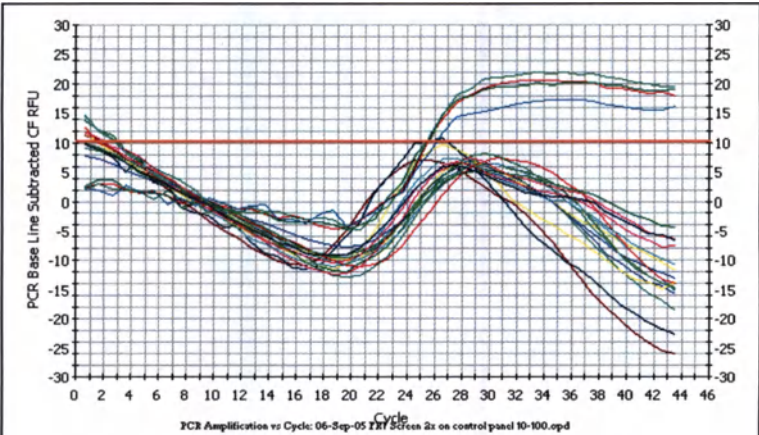


Рис.5. Неправильно обработанные кривые (Fam) – «опрокидывающиеся» кривые при установленном параметре автоматического расчета базовой линии (Auto Calculated)

III. Анализ результатов.

	Threshold Cycle Ct	Identifier
C3	31.1	
C4	26.2	
C5	31.4	
C6	26.9	
C8	31.4	
C9	33.2	
C10	34.0	
D3	30.0	
D4	25.2	
D5	33.6	
D6	32.0	
D7	27.9	
D10	26.8	
E3	33.3	
E4	28.7	
E5	30.5	
E6	26.5	

Рис.6. Таблица результатов

АмплиСенс® FRT ВПЧ ВКР Скрин IQ

Дата:

Описание:

Обозначить парные
неподписанные как пустые

Обозначить

Порог слабых
образцов, Ct

ВК	HPV A9	HPV A7+
25	33	32

Последовательность установки пробирок в
прибор

комбинировано смеси A9 - A7+, A9 - A7+...

Данные прибора

№№	Обозначение образца	Гат (ВК)	HEX (HPV)
	Identifier	Ct	Ct
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Результаты обсчета

№№	Обозначение образца	Результаты		
		ветвь A9	ветвь A7, 51, 56	общий
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*

Рис.7. Программа «AmpliSens FRT HR HPV Screen iQ Results Matrix.xls»

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ ПРИБОРА «SmartCycler» («Cepheid», США)

Проведение реакции амплификации

1. Включить прибор и запустить программу «SmartCycler».
2. Перед установкой реакционных пробирок в прибор необходимо отцентрифугировать их в течение 3 с на прилагающейся к прибору «SmartCycler» центрифуге.
3. Установить пробирки в прибор.

Варианты установки пробирок.

Для дальнейшей автоматической обработки результатов выберите один из следующих способов установки пробирок в прибор:

- Вариант 1: Установите последовательно в 2 соседних (по номеру) модуля пару пробирок, соответствующих одному клиническому образцу: сначала со смесью ВПЧ FRT **A9** затем ВПЧ FRT **A7+**. Затем пару, соответствующую следующему образцу и т.д.
- Вариант 2 (обратный): Установите последовательно в 2 соседних (по номеру) модуля пару пробирок, соответствующих одному клиническому образцу: сначала со смесью ВПЧ FRT **A7+** затем ВПЧ FRT **A9**. Затем пару, соответствующую следующему образцу и т.д.

ВНИМАНИЕ! Пары пробирок устанавливаются по горизонтали слева направо.

4. В основном меню программы выбрать пункт «**Define Protocols**». В открывшемся в нижнем левом углу экрана выбрать кнопку «**New Protocol**». Дать название протоколу и задать следующие параметры эксперимента (см. табл. 9):

Таблица 9

**Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов**

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Stage 1. Hold	95	900 с	–	1
Stage 2. Hold	65	120 с	–	1
Stage 3. 3-Temperature Cycle	95	20 с	–	5
	63	30 с	–	
	65	60 с	–	
Stage 4. 3-Temperature Cycle	95	25 с	–	42
	60	30 с	–	
	65	60 с	Включено	

5. В нижней части окна выбрать кнопку «**Save Protocol**».
6. Нажать кнопку «**Create Run**» в основном меню программы.
7. В левой центральной части экрана нажать кнопку «**Dye set**» и выбрать комбинацию **FTTC25**.
8. В центре экрана нажать кнопку «**Add/Remove Sites**» и в появившемся окне выбрать нужный протокол (программу) и сайты, в которых будет проводиться анализ. Нажать кнопку «**OK**».
9. Запустить выполнение программы эксперимента кнопкой «**Start Run**» в нижней части экрана. В появившемся диалоговом окне указать имя файла, в котором будут сохранены все данные эксперимента.
10. В открывшемся окне можно посмотреть основные параметры эксперимента.
11. Для присвоения названия образцам нажать кнопку «**Results Table**». В открывшейся таблице в колонке Sample ID дать название образцам. Название можно присваивать только одному из образцов данной пары. Согласно инструкции к прибору, Контрольным образцам K1, K2, K3 необходимо обозначить как Standart и задать значения калибраторов из вкладыша, отрицательному «-».

12. Интенсивность флюоресценции можно наблюдать в ходе эксперимента: по каналу TET/JOE для ДНК ВПЧ и по каналу FAM для внутреннего контроля.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Обработка данных

1. После проведения амплификации производится расчёт концентрации ДНК ВПЧ по двум пробиркам.
2. Выберите в меню пункт «**Analysis settings**».
3. В открывшемся окне задайте уровень пороговой линии равный **10** для каналов FAM и TET/JOE и нажмите кнопку «Update Analysis» в нижней части окна. В таблице результатов (окно «**Results Table**») для каждого образца появятся значения пороговых циклов (Ct) и концентрации.
4. Нажмите кнопку «Export» в нижней левой части окна программы. В появившемся диалоговом окне установите галочку только напротив пункта «Results table and Analysis Settings». Нажмите кнопку «Export». Присвойте имя файлу.
5. Конечный результат нормированной концентрации ДНК ВПЧ по двум пробиркам на количество клеток человека рассчитывается по формуле:
А) число копий ДНК ВПЧ по первой пробирке разделить на число копий ДНК человека по первой пробирке, полученный результат умножить на 200000;
Б) число копий ДНК ВПЧ по второй пробирке разделить на число копий ДНК человека по второй пробирке, полученный результат умножить на 200000;
В) результат расчёта по первой пробирке сложить с результатом по второй пробирке;
Г) вычислить десятичный логарифм из полученного значения;
Д) искомый результат является концентрацией ДНК ВПЧ в lg копий ДНК ВПЧ, приходящийся на **10⁵** клеток:

$\lg(\text{ВПЧ}_{\text{на } 100 \text{ тыс. клеток}} =$

$$\lg\left(\frac{\text{количество_ДНК_ВПЧ_1}}{\text{количество_ДНК_человека_1}} * 200000 + \frac{\text{количество_ДНК_ВПЧ_2}}{\text{количество_ДНК_человека_2}} * 200000\right)$$

6. Сохраните файл Microsoft® Excel под другим именем.

Анализ данных

Вся постановка считается **валидной** если:

- в отрицательных контролях сигнал отсутствует по всем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow/HEX/TET);
- во всех калибраторах выявляются сигналы по всем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow/HEX/TET).
- значение коэффициента корреляции калибровочных прямых для всех каналов не ниже 0,98.

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

Результат выявления ДНК ВПЧ данного образца считается:

Отрицательным, если в обеих пробирках для данного образца регистрируется сигнал внутреннего контроля (ВК) (канал FAM/Green) и при этом количество клеток человека на реакцию более 500.

Положительным, если регистрируется сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX/TET хотя бы в одной из двух пробирок. Результат:

- один или несколько типов из филогенетической группы A9 (если сигнал выявлен в пробирке со смесью FRT ВПЧ ВКР A9);
- один или несколько типов из филогенетической группы A7 или 51/56 типы (если сигнал выявлен в пробирке со смесью FRT ВПЧ ВКР A7+).

Невалидным,

- если ни одной из 2-х пробирок не регистрируется положительных сигналов по каналам (JOE/Yellow/HEX/TET) (A9, A7, A5/A6), а сигнал внутреннего контроля (FAM/Green) не регистрируется или количество клеток человека на реакцию не превышает 500.
- в образце регистрируется слабopоложительный(ые) сигнал(ы) по каналу JOE/Yellow/HEX/TET, однако сигнал внутреннего контроля (FAM/Green) не регистрируется или количество клеток человека не превышает 500.

ВНИМАНИЕ! Невалидный результат требует повторного исследования образца, начиная с этапа выделения ДНК или взятие материала.

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
При приготовлении смеси реагентов не внесена TaqF-полимераза	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ ЧЕТЫРЕХКАНАЛЬНОГО ПРИБОРА «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

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

Проведение реакции амплификации

1. Включите прибор, запустите программу RotorGene.
2. Установите пробирки в карусель прибора так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установите карусель в прибор, закройте крышку.

ВНИМАНИЕ! Если вы не полностью заполняете карусель прибора, то ее следует уравновесить. Для этого заполните незанятые места пустыми пробирками (*не используйте пробирки от предыдущих экспериментов*). Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Запустите программу амплификации. Для этого используйте один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для запуска программы амплификации.

ВНИМАНИЕ! Для проведения амплификации настоятельно рекомендуется использование прилагаемого к набору реагентов шаблонного файла «*AmpliSens FRT HR HPV Screen RG4x.ret*».

Для использования шаблона для данного набора реагентов необходимо предварительно скопировать прилагающийся к набору реагентов файл «*AmpliSens FRT HR HPV Screen RG4x.ret*» в папку «Templates» папки программы «Rotor-Gene». При установке «Rotor-Gene» по умолчанию путь к указанной папке следующий: «C:\Program Files\RotorGene 6\Templates» - RotorGene 3000 и «C:\Program Files\RotorGene 6000 Software\Templates» - RotorGene 6000. После выполнения этой процедуры в окне «New Run»/«Новый тест» (вызывается кнопкой «New»/«Новый» панели инструментов) появится пункт «*AmpliSens FRT HR HPV Screen RG4x*». Его и следует выбирать для запуска нового эксперимента.

Примечание: шаблонный файл можно открыть из другой папки. Для этого в окне «New Run»/«Новый тест» выберите вкладку «Advanced»/«Детальный мастер» и в ней пункт «Open A Template In Another Folder...»/«Открыть шаблон из другой папки...», далее перейдите в папку, содержащую файл «AmpliSens FRT HR HPV Screen RG4x.ret» и откройте его.

В шаблонном файле уже заданы все необходимые параметры амплификации, поэтому необходимо только внести данные об эксперименте и расшифровку образцов.

Самостоятельное программирование

- Запустите мастер нового эксперимента в режиме «Advanced»/«Детальный мастер».
- В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси *Reaction volume/Объем реакции* (μL) равный **25**. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 так же необходимо установить галочку напротив параметра **15 μL oil layer volume/15 μL объем масла/воска**.
- задайте программу амплификации (см. табл. 10).

Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	—	1
Hold2/Удерж. темп-ры2	65	2 мин	—	1
Cycling	95	20 с	—	5
	64 Touchdown: 1 deg. per cycle / Снижать темп-ру шага на 1 град. каждый цикл	25 с	—	
	65	55 с	—	
Cycling2/Циклирование2	95	15 с	—	40
	60	25 с	—	
	65	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	

Примечание. Для задания программы амплификации можно воспользоваться прилагаемым к набору файлом в формате ПО «RotorGene» (AmpliSens FRT HR HPV Screen RG4x Program.pro).

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1 RG» (см. табл. 11). С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП). Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

Таблица 11

Программа амплификации «АмплиСенс-1 RG»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	—	1
Cycling/ Циклирование	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
Cycling2/Циклирование2	95	5 с	—	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	—	

Примечание. Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

- задайте параметры калибровки «Calibrate»/«Gain Optimisation»/«Опт.уровня сигн.» в «Advanced»/«Детальный мастер» - мастере нового эксперимента):
 - а) осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red (нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-ных»;

- б) калибровать перед первым измерением («Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции»);
- в) установка калибровки канала для всех красителей от 4FI до 8FI (кнопка «Edit...»/«Правка...», окно «Auto gain calibration channel settings»/«Авто-оптимизация уровня сигнала»).
4. Запустите амплификацию, выбрав кнопку «Start run»/«Старт» и присвоив имя файлу эксперимента.
5. Внесите данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке «Name» укажите названия/номера исследуемых клинических образцов. Напротив всех исследуемых образцов, включая контрольные, установите тип «Unknown»/«Образец». Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам установите тип «None»/«Пусто». Калибраторы назовите «K1», «K2», «K3», отрицательный контроль – «K-».
- ВНИМАНИЕ!** При установке типа «None»/«Пусто» данные образца анализироваться не будут!

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Оценка данных

Просмотрите необработанные данные прибора по всем четырем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red) выбирая кнопки «Cycling A...» на панели «Channels»/«Каналы». Обратите внимание на следующие моменты:

- среди всех сигналов образцов по каналу должен быть хотя бы один положительный (положительный сигнал имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции (см. рис. 1). При правильной постановке и течении эксперимента обязательно должны присутствовать сигналы калибраторов K1, K2, K3).

ВНИМАНИЕ! При полном отсутствии положительных сигналов по флуоресцентному каналу обработка данных канала может дать некорректный результат.

- наличие образцов с фоновым сигналом, резко отличающимся от большинства свидетельствует об ошибке при внесении в пробирку реакционной смеси или образца ДНК (см. рис. 2б и раздел «Возможные проблемы и ошибки»).

Обработка данных

1. Удостоверьтесь, что все анализируемые образцы активны в легенде справа.
2. Запустите функцию «Analysis»/«Анализ», выберите вкладку «Quantitation»/«Количественный» и в ней канал FAM/Green, затем кнопку «Show»/«Показать».
3. После открытия окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» вручную установите пороговый цикл: Threshold/Порог = 0,03.
4. Выберите линейный тип шкалы («Linear scale»/«Линейная шкала»), активируйте параметры «Dynamic tube»/«Динамич.фон», «Slope Correct»/«Коррект.уклона».
5. Выберите параметр «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» и установите значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона - ПФ) равным 20 %.

ВНИМАНИЕ! Достаточно редко из-за низходящего характера кривых в начале эксперимента возможно явление пересечения линии порога (Threshold/Порог) и кривых флуоресценции на первых циклах, при этом программа RotorGene может засчитывать данные пересечения за положительный сигнал (рис. 7). Для устранения эффекта воспользуйтесь функцией «Eliminate cycles before...»/«Исключить циклы до...», задав значение 5, проигнорировав тем самым пересечение порога и кривой флуоресценции на первых пяти циклах.

6. В таблице результатов («Quant. Results»/«Количественные результаты»): выделите колонку «Name»/«Имя» однократно щелкнув мышью на заголовке. Скопируйте колонку, выбрав «Сору»/«Копировать» из контекстного меню (вызывается правой кнопкой мыши) (рис. 9).

7. Откройте прилагающийся к набору реагентов файл Microsoft® Excel «AmpliSens FRT HR HPV SCREEN Quant Results Matrix.xls», 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 выберите в меню пункт «Сервис»>«Макрос»>«Безопасность...» и установите средний уровень безопасности. 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».
8. Установите курсор на ячейку «Name» столбца «Обозначение» и выберите «Вставить» из контекстного меню (рис. 10).
9. Аналогично выберите и скопируйте колонку «Ct» из таблицы результатов («Quant.Results»/«Количественные результаты»). Установите курсор в таблице Excel в ячейку «Ct» под названием соответствующего флуоресцентного красителя.
10. Повторите процедуру для других флуоресцентных красителей.
11. Установите режим «Количественный анализ», внутренняя калибровка.
12. Внесите данные концентраций калибраторов в таблицу «Знач. калибр.» в соответствие с вкладышем к данной серии набора реагентов.
13. В столбце «Обозначение» проверьте, что калибратор K1 имеет имя «K1», калибратор K2 имеет имя «K2», калибратор K3 имеет имя «K3» (без пробела между буквой K и цифрой), отрицательный контроль – «K-» или «-».
14. Сохраните файл Microsoft® Excel под другим именем.

Анализ данных

Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажмите кнопку результаты. В колонке «результаты» появятся выявленные в образцах филогенетические группы ВПЧ, результат: положительный (pos), отрицательный (neg), слабopоложительный (weak), невалидный (N/V). Далее в таблице отображается количество клеток человека на реакцию, используется для оценки валидности образца. Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по группам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии со следующим:

Результат Ig (копий ДНК ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

Перед использованием набора реагентов рекомендуется изучить этот раздел.

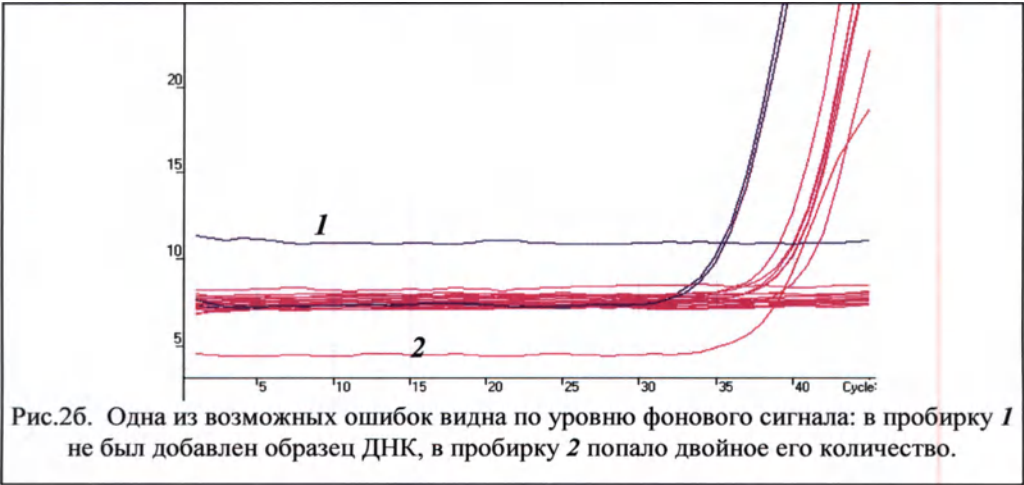
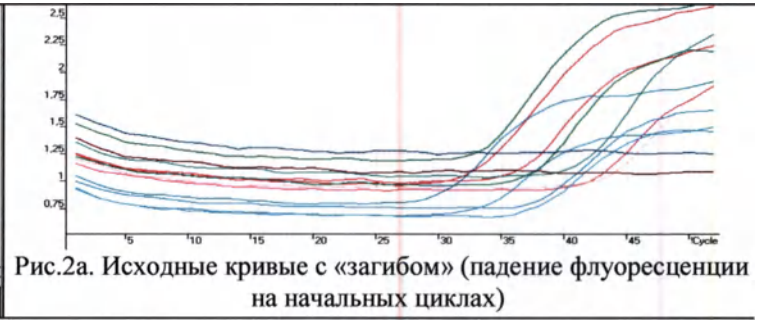
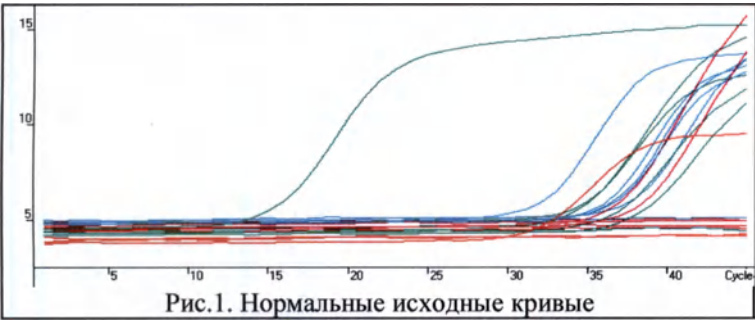
Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Отрицательные образцы анализируются программой RotorGene как положительные.	Неправильная математическая обработка отрицательных образцов при наличии участка падения флуоресценции на начальных циклах (рис. 2а, 8)	Типичный положительный образец имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции (рис. 1, 3 – 6). Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид довольно прямых линий, идущих снизу вверх (рис. 8)	Необходимо воспользоваться функцией «Ignore First»/«Игнор. первые» выбрав значение 5 циклов. Если это не приводит к должному результату, попробуйте увеличить это значение на 1 – 5.
	Пересечение линией порога нисходящих кривых флуоресценции	На графике обработанных кривых флуоресценции красная линия порога	воспользуйтесь функцией «Eliminate cycles before...»/

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
	на начальных циклах (рис.7)	(Threshold) пересекает или «задевает» кривые флуоресценции в левой части графика (первые циклы) (рис. 7)	«Исключить циклы до...», задав значение 5, (игнорируется пересечение порога и кривой флуоресценции на первых 5 циклах)
Снижение чувствительности и из-за загрязнения линз прибора	Загрязнение линз ведет к снижению эффективности возбуждения и регистрации флуоресценции, что в первую очередь сказывается на образцах с малым количеством специфичной ДНК, дающих малое увеличение флуоресценции	Низкие значения фонового сигнала по всем 4 каналам измерения флуоресценции (<1) при максимальном значении множителя «gain» (10).	Проводить очистку горизонтальной и вертикальной линз прибора сухим одноразовым ватным тампоном не реже 1 раза в месяц
Снижение чувствительности и из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов комплекта (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в загрязненных условиях) могут приводить к разрушению олигонуклеотидов	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами <u>той же серии</u> . Выявляется по снижению значения автоматически выбираемого коэффициента умножения gain в разных экспериментах более чем на 2 единицы (при использовании <u>одного и того же прибора</u>). ВНИМАНИЕ! эффект увеличения множителя gain может также наблюдаться после очистки линз прибора от сильного загрязнения	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. <i>Хранение</i>)
Снижение чувствительности и из-за снижения активности TaqF-полимеразы	Неправильное хранение полимеразы или нарушение условий стерильности приводит к разрушению фермента	Выявляется по отсутствию сигнала положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля выше порога слабых образцов	Использовать адекватно хранящийся (см. <i>Хранение</i>) или новый фермент.

Примечание: Информацию по всем установленным параметрам эксперимента, а так же отчет по автокалибровке можно найти, просмотрев установки эксперимента (кнопка «Settings»/«Установки»). В частности, вкладка «Messages»/«Сообщения» пункт «Autocalibration Log Messages» - отчет об автокалибровке - отчет об автокалибровке.

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых) (рис. 2б). Образец отрицательный.	Повторное исследование образца, начиная с этапа ПЦР
В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси <i>или</i> внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых) (рис. 2б).	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование
Не задан параметр автокалибровки от 4FI до 8FI или ошибка в первой пробирке барабана (ее отсутствие, неправильное внесение образца ДНК или реакционной смеси)	Большинство фоновых сигналов флуоресценции меньше 1 или больше 20	Задать параметр при следующем запуске. Если произошел «зашкал» или сигналы очень слабые (при обработке нет положительных сигналов, фон меньше 0,5) необходим повтор исследования начиная с этапа ПЦР
При приготовлении смеси реагентов не внесена TaqF-полимераза	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование, с правильно приготовленными смесями начиная с этапа ПЦР

ПРИЛОЖЕНИЕ. РИСУНКИ
I. Необработанные данные.



II. Обработанные данные.

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

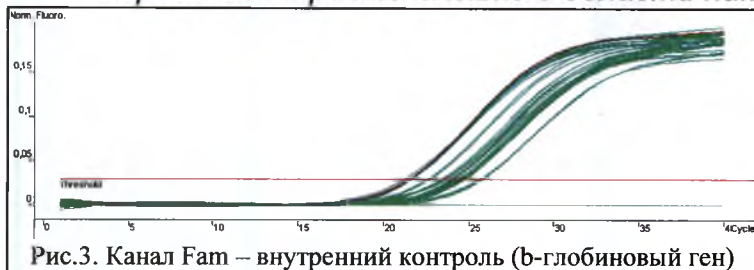


Рис.3. Канал Fam -- внутренний контроль (b-глобиновый ген)

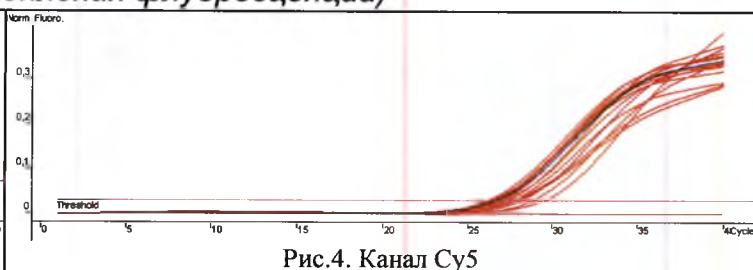


Рис.4. Канал Cy5

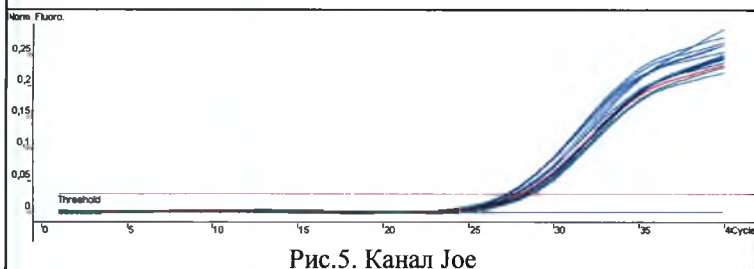


Рис.5. Канал Joe

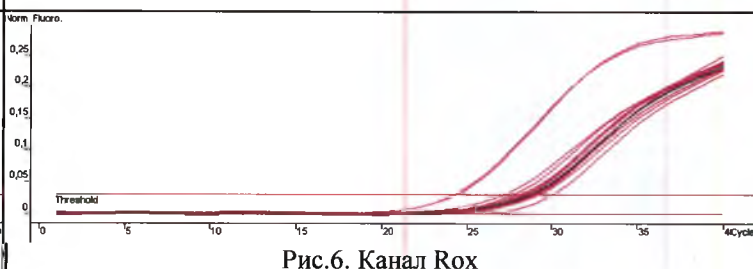


Рис.6. Канал Rox

б) неправильная обработка кривых



Рис.7. Линия порога пересекает кривые флуоресценции дважды

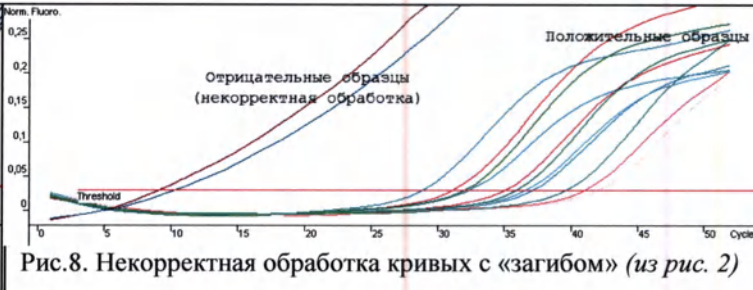


Рис.8. Некорректная обработка кривых с «загибом» (из рис. 2)

III. Анализ результатов.

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

Рис.9. таблица результатов «Quant.Results»

АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Timp FRT

Дата: Прибор: Описание:

☐ Количественный анализ

☒ Качественный анализ

☒ Внутренняя калибровка (калибраты в текущей постановке)

☐ Внешняя калибровка (задайте параметры К и В)

Этап, номер

GLOB
Fam/Green

BP416
Joe/Yellow

BP418
Rox/Orange

BP451
Cy5/Red

K1

71756

42300

26498

125188

K2

8400

943

1222

1347

K3

913

47

46

139

Очистить таблицу

Обозначить неподписанные

№ п/п	Обозначение	Fam Green (B1)	Joe Yellow (A8)	Rox Orange (A7)	Cy5 Red (A5/A6)	Результаты							
	Name	C1	C1	C1	C1	Филогенетическая группа	Кач.	кол-во клеток	Ig B1H A8/ 10 ⁵ клеток	Ig B1H A7/ 10 ⁵ клеток	Ig B1H A5A6/ 10 ⁵ клеток	СММ Ig B1H/ 10 ⁵ клеток	Клиническая значимость
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													

Рис.10. программа «AmpliSens FRT HR HPV Screen Quant Results Matrix.xls»

Рис.10. программа «AmpliSens FRT HR HPV Screen Quant Results Matrix.xls»

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ ПРИБОРА «iQ5» («BioRad», США)

Проведение реакции амплификации

- Включите прибор, запустите программу iQ5

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

- В группе «Workshop» задайте и сохраните протокол амплификации согласно таблице:

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Cycle 1	95	15 мин	—	1
Cycle 2	95	15 с	—	6
	65	55 с	—	
	<u>Touchdown:</u> 1 deg. per cycle			
Cycle 3	65	25 с	—	41
	95	15 с	—	
	60	55 с	Real-time	
	65	25 с	—	

Для задания программы можно воспользоваться прилагающимся к набору реагентов файлом «AmpliSens FRT HR HPV Screen iQ5.tmo».

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать универсальную программу амплификации и детекции «АмплиСенс-1 iQ». С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП).

Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

Программа амплификации «АмплиСенс-1 iQ»

Этап	Температура	Время	Измерение флуор.	Повторов
1	95 °C	15 мин	—	1
2	95 °C	5 с	—	5
	60 °C	20 с	—	
	72 °C	15 с	—	
3	95 °C	5 с	—	40
	60 °C	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72 °C	15 с		

Примечание. Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

- Создайте новую плашку образцов («Plate Setup»). Обозначьте образцы. Задайте измерение флуоресценции по четырем каналам: FAM, HEX, ROX, Cy5.
- Нажмите кнопку Run. Выберите режим измерения факторов лунок (Well factor). Допускается использование как режима с измерением факторов лунок по экспериментальным пробиркам, так и фиксированных факторов лунок (рекомендуется). Запустите эксперимент.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Обработка данных

- Перейдите в режим «Data Analysis».
- Просматривайте данные отдельно по каждому из четырех каналов.
- Для каждого канала проверьте 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, повысьте уровень порога.

4. Активируйте кнопку «Results» (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).
5. Щелкните правой кнопкой мыши на появившейся таблице с результатами. В выпадающем меню выберите «Export to Excel». Согласитесь на сохранение файла. В случае если на компьютере установлена программа Microsoft Excel, данный файл откроется автоматически. (Если данная программа не установлена, дальнейшая обработка осуществляется на компьютере с Excel). Структура данного файла такова, что сначала последовательно следуют все результаты по каналу Fam, затем Hex, Rox и Cy5.
6. Откройте прилагающийся к набору файл Microsoft® Excel «AmpliSens HR HPV SCREEN Quant 96 Results Matrix.xls» (программа расчета 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 выберите в меню пункт «Сервис»>«Макрос»>«Безопасность...» и установите средний уровень безопасности.

7. В файле с результатами выделите и скопируйте ячейки столбца «Threshold Cycle (Ct)», соответствующие каналу Fam. Перейдите к программе расчета результатов и вставьте скопированные ячейки в столбец Fam, начиная с первой ячейки.
8. Аналогично скопируйте ячейки столбца «Threshold Cycle (Ct)», соответствующие каналу Hex, затем Rox и Cy5 в столбцы Hex, Rox и Cy5 программы расчета результатов.
9. Скопируйте имена образцов из столбца «Identifier» (если они обозначались) в столбец «Имя» программы расчета.
10. В колонке «Имя» программы расчета результатов обозначьте образцы, соответствующие калибраторам строго как K1, K2 и K3, отрицательные контроли как «-» или «К-». Ячейки, не соответствующие экспериментальным пробиркам, – знаком #.
11. Сохраните файл Microsoft® Excel под другим именем.
12. Нажмите кнопку «Результаты».

Анализ данных

Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажмите кнопку результаты. В колонке «результаты» появятся выявленные в образцах филогенетические группы ВПЧ, результат: положительный (pos), отрицательный (neg), слабopоложительный (weak), невалидный (N/V). Далее в таблице отображается количество клеток человека на реакцию, используется для оценки валидности образца. Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по группам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствии со следующим:

Результат Ig (копий ДНК ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

Перед использованием набора реагентов рекомендуется изучить этот раздел.

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Снижение чувствительности из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов комплекта (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в загрязненных условиях) могут приводить к разрушению олигонуклеотидов	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами <u>той же серии</u> . Выявляется по увеличению значения фоновой флуоресценции (флуоресценция в начале эксперимента, оценивается в режиме Background subtracted) в разных экспериментах более чем в 2 раза (<u>при использовании одного и того же прибора</u>). ВНИМАНИЕ! эффект увеличения флуоресценции может также наблюдаться после смены лампы, перекалибровки, очистки оптической системы прибора	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. <i>Хранение</i>)
Снижение чувствительности из-за снижения активности TaqF-полимеразы	Неправильное хранение полимеразы или нарушение условий стерильности приводит к разрушению фермента	Выявляется по отсутствию сигнала положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля значительно выше обычного	Использовать адекватно хранящийся (см. <i>Хранение</i>) или новый фермент.

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых – режим отображения Background subtracted). Образец отрицательный.	Повторное исследование образца

В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси <i>или</i> внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых – режим отображения Background subtracted)	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование
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	Вызвать окно «BaseLine Threshold» (правая кнопка мыши на графике флуоресценции) задать диапазон расчета базовой линии, начиная с первого после ступени цикла
При приготовлении смеси реагентов не внесена TaqF-полимераза	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями

ПРИЛОЖЕНИЕ. РИСУНКИ

I. Необработанные данные (Режим отображения *Background subtracted*).

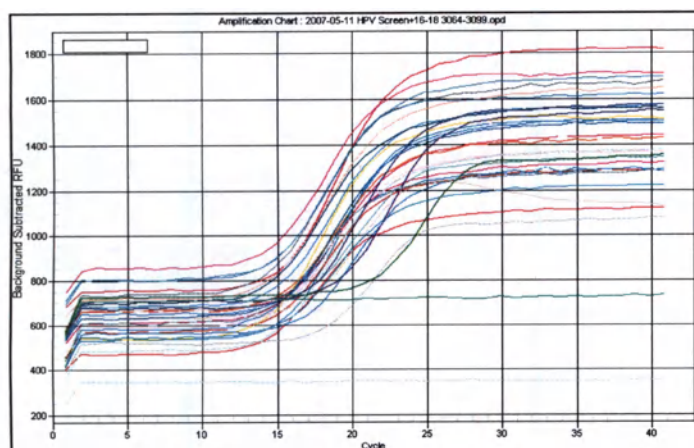


Рис.1. Нормальные исходные кривые (Fam)

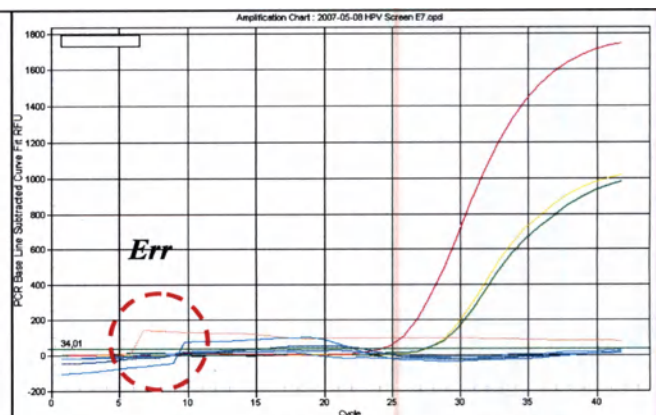


Рис.2. Одна из возможных ошибок «ступенька» базовой линии: в образцах *Err* до запуска эксперимента не были сброшены капли смеси со стенок пробирки, смеси «провалились» в ходе амплификации.

II. Обработанные данные

нормальные кривые после обработки, типичный S-образный вид, правильное расположение порогов (**Режим отображения PCR Base Line Subtracted Curve Fit**)

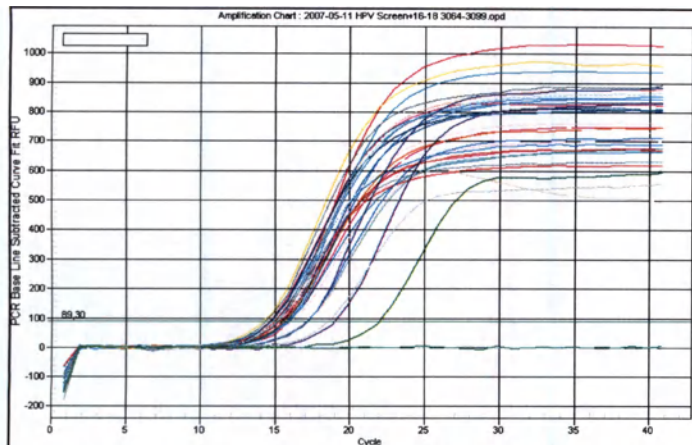


Рис.3. Канал Fat – внутренний контроль (b-глобиновый ген)

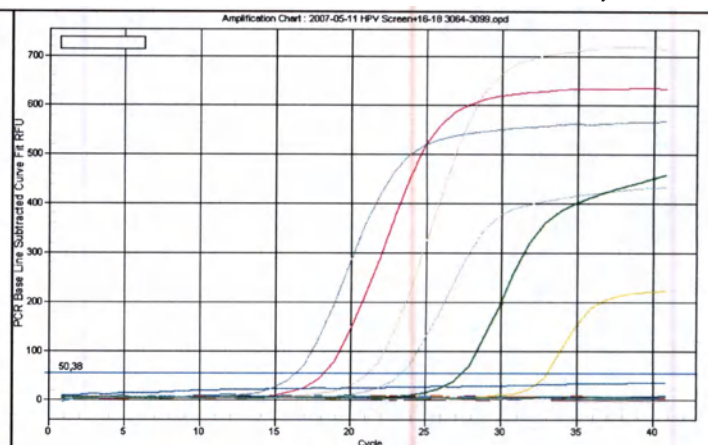


Рис.4. Канал Cy5

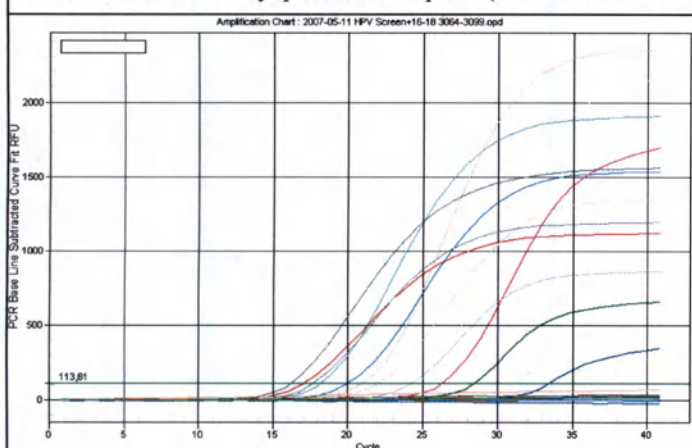


Рис.5. Канал Joe

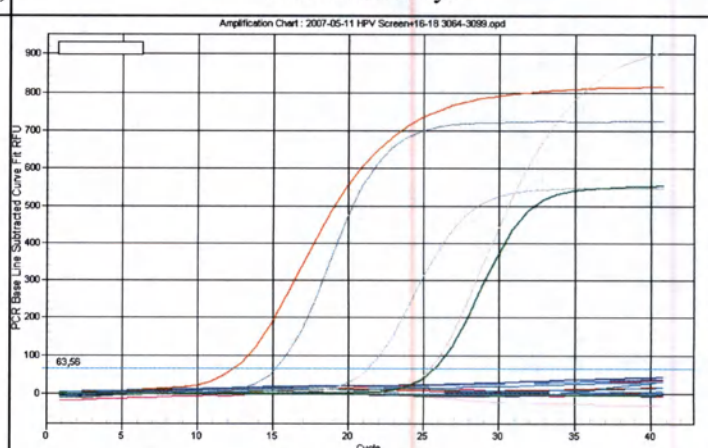


Рис.6. Канал Rox

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ ПРИБОРА «Mx3000P» («Stratagene», США)

Проведение реакции амплификации

1. Включите прибор, запустите программу Stratagene Mx3000P.
2. В окне «New Experiment Options» выберите пункт «Quantitative PCR (Multiple Standards)» и установите флажок «Turn lamp on for warm-up».

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

3. Установите пробирки в прибор, закройте 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.
5. В меню «Instrument» программы Mx3000P выбрать пункт «Filter Set Gain Settings...». В открывшемся окне необходимо установить параметры коэффициентов умножения:

Cy5	x4
ROX	x1
HEX/JOE	x4
FAM	x4

6. На вкладке «Plate Setup» задайте параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого:
 - выберите все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки (удерживая клавишу *Ctrl* и выделяя необходимый диапазон мышью);
 - в выпадающем меню «Well type» выберите тип «Unknown» и поле «Collect fluorescence data» установите все четыре флажка «FAM», «HEX», «ROX», «Cy5»;
 - далее дважды щелкая по каждой ячейке внесите подписи пробирок (Окно «Well Information»), положительный контроль обозначьте как «+», отрицательный как «-» (внести подписи образцов так же можно во время амплификации или после её окончания, вернувшись на эту вкладку).

7. Перейдите на вкладку «Thermal Profile Setup», задайте программу амплификации.

Для этого используйте один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется).

Нажмите кнопку «Import...» справа от изображения профиля термоциклирования. Перейдите в папку, содержащую прилагаемый к набору файл «AmpliSens FRT HR HPV Screen Mx.mxr» и откройте его. В окне «Thermal Profile» появиться необходимый профиль термоциклирования

Самостоятельное программирование

Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов:

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Segment 1	95	15 мин	–	1
Segment 2	65	2 мин	–	1
Segment 3 (Cycling)	95	20 с	–	5
	64 Touchdown: 1 deg. per cycle	25 с	–	
	65	55 с	–	
Segment 4 (Cycling)	95	20 с	–	40
	60	25 с	–	
	65	55 с	по Cy5, FAM, JOE, ROX	

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать **универсальную программу** амплификации и детекции **«АмплиСенс-1 Мх»**. С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП).

Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

Программа амплификации «АмплиСенс-1 Мх»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуор.	Повторов
Segment 1	95	15 мин	–	1
Segment 2 (Cycling)	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Segment 3 (Cycling)	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

Примечание. Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

- Запустите амплификацию, выбрав кнопку «Run», затем «Start» и присвоив имя файлу эксперимента.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Обработка данных

- В программе *Mx3000P* перейдите в раздел «Analysis» выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
- На открывшейся вкладке «Analysis Selection/Setup» убедитесь, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок). В противном случае выберите все исследуемые образцы, удерживая клавишу Ctrl и выделяя необходимый диапазон мышью.
- Перейдите на вкладку «Results».
- В нижней панели «Dyes shown» активируйте отображение флуоресцентного канала Cy5 и отключите отображение других каналов. В поле «Threshold fluorescence» установите значение порога для Cy5 равным 150. Далее последовательно включайте отображение следующего флуоресцентного канала, отключая предыдущий, и задайте значения порогов согласно таблице:

Cy5	150
ROX	150
HEX/JOE	150
FAM	150

- Далее активируйте отображение всех четырех флуоресцентных каналов (кнопки «Cy5» «ROX» «HEX» «FAM» нажаты в поле «Dyes Shown» внизу окна программы).
- В поле «Threshold fluorescence» убедитесь, что галочки стоят напротив всех четырех флуоресцентных каналов.
- В поле «Area to analyze» выберите пункт «Text Report». Визуально удостоверьтесь, что все данные сортированы по имени красителя (колонка «Dye»). Для этого однократно нажмите на имя колонки «Dye» (рис. 9).
- Перейдите в меню «File», далее к пункту «Export Text Report» и далее к пункту «Export Text Report to Excel». Откроется окно Microsoft Excel.
- Откройте прилагающийся к набору реагентов файл Microsoft® Excel «AmpliSens FRT HR HPV SCREEN Quant 96 Results Matrix.xls» (программа автоматической интерпретации результатов), согласитесь на включение макроса.

Примечание: если при открытии документа Excel макрос не активируется (выдается соответствующее сообщение, кнопка «Результаты» неактивна) необходимо изменить

уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выберите в меню пункт «Сервис»>«Макрос»>«Безопасность...» и установите средний уровень безопасности.

10. Скопируйте из открывшегося окна «Text Report» имена образцов в колонку «Обозначение» программы автоматического учета результатов.
11. Скопируйте из открывшегося окна «Text Report» имена образцов в колонку «Обозначение» программы автоматического учета результатов. В случае, если исследовалось более 36 образцов, сначала проанализируйте данные первых 36, затем откройте новую копию программы и проанализируйте оставшиеся образцы.
12. Далее скопируйте значения пороговых циклов для всех четырех каналов в соответствующие ячейки программы автоматического учета результатов.
13. Установите режим «Количественный анализ», внутренняя калибровка.
14. Внесите данные концентраций калибраторов в таблицу «Знач. калибр.» в соответствие с вкладышем к данной серии набора реагентов.
15. В столбце «Обозначение» проверьте, что калибратор K1 имеет имя «K1», калибратор K2 имеет имя «K2», калибратор K3 имеет имя «K3» (без пробела между буквой K и цифрой).
16. Сохраните файл Microsoft® Excel под другим именем.
17. Нажмите кнопку «Результаты».

Анализ данных

Анализ данных осуществляется автоматически. После внесения всех данных в матрицу данных Excel, нажмите кнопку результаты. В колонке «результаты» появятся выявленные в образцах филогенетические группы ВПЧ, результат: положительный (pos), отрицательный (neg), слабopоложительный (weak), невалидный (N/V). Далее в таблице отображается количество клеток человека на реакцию, используется для оценки валидности образца. Далее приводятся расчеты концентрации ДНК ВПЧ, выраженной в Ig на 10^5 клеток по группам и суммарная вирусная нагрузка. В последнем столбце приводится возможная трактовка клинической значимости результата в соответствие со следующим:

Результат Ig (копий ДНК ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3-5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

Перед использованием набора реагентов рекомендуется изучить этот раздел.

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Снижение чувствительности из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов комплекта (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в загрязненных условиях) могут приводить к разрушению олигонуклеотидов	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами <u>той же серии</u> . Выявляется по увеличению значения фоновой флуоресценции (флуоресценция в начале эксперимента, оценивается в режиме	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. <i>Хранение</i>)

		R) в разных экспериментах более чем в 2 раза (<i>при использовании <u>одного и того же прибора</u></i>). ВНИМАНИЕ! эффект увеличения флуоресценции может также наблюдаться после очистки оптической системы прибора	
Снижение чувствительности из-за снижения активности TaqF-полимеразы	Неправильное хранение полимеразы или нарушение условий стерильности приводит к разрушению фермента	Выявляется по отсутствию сигнала положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля выше порога слабых образцов	Использовать адекватно хранящийся (см. <i>Хранение</i>) или новый фермент.

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых – режим отображения R – multicomponent view). Образец отрицательный.	Повторное исследование образца
В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси <i>или</i> внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых – режим отображения R – multicomponent view)	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование
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
При приготовлении смеси реагентов не внесена TaqF-полимераза	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями

ПРИЛОЖЕНИЕ. РИСУНКИ

I. Необработанные данные (Режим отображения *R*).

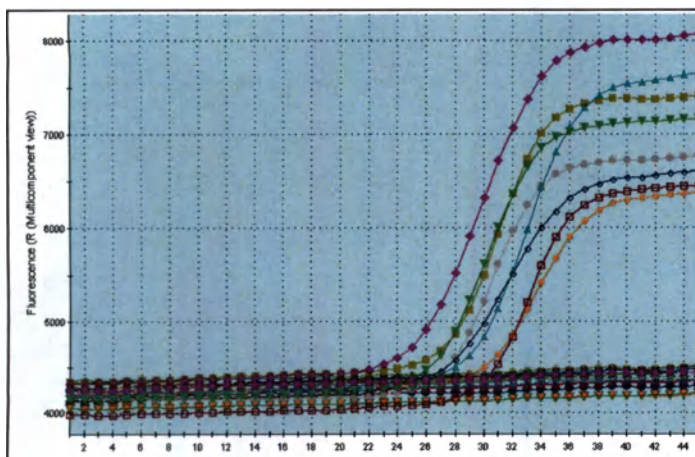


Рис.1. Нормальные исходные кривые

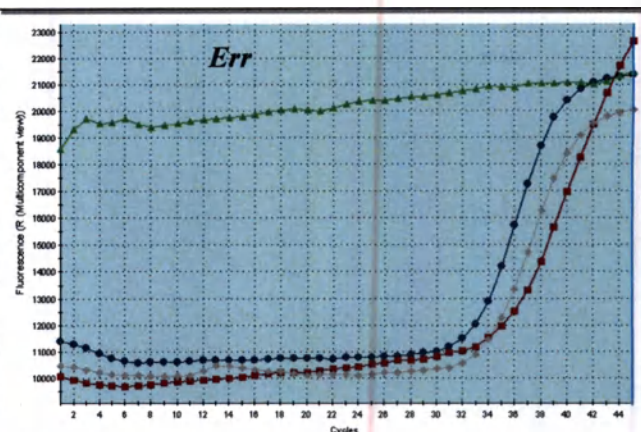


Рис.2. Одна из возможных ошибок видна по уровню фонового сигнала: в пробирку *Err* не был добавлен образец ДНК.

II. Обработанные данные

нормальные кривые после обработки, режим *dR* (типичный S-образный вид)

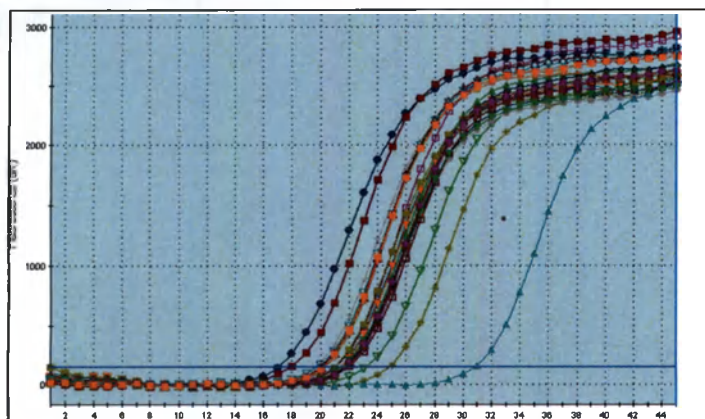


Рис.3. Канал Fam – внутренний контроль (b-глобиновый ген)

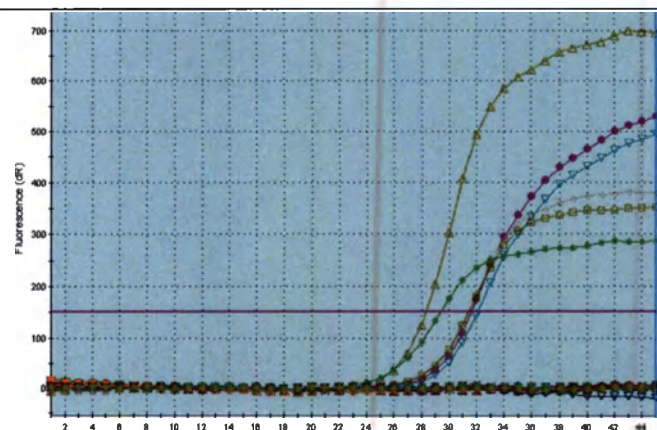


Рис.4. Канал Cy5

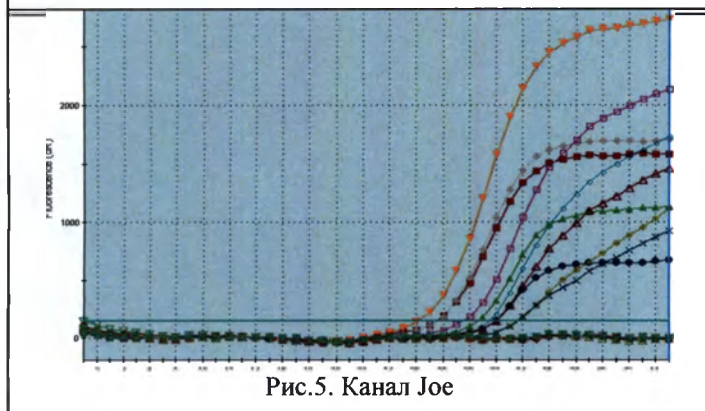


Рис.5. Канал Joe

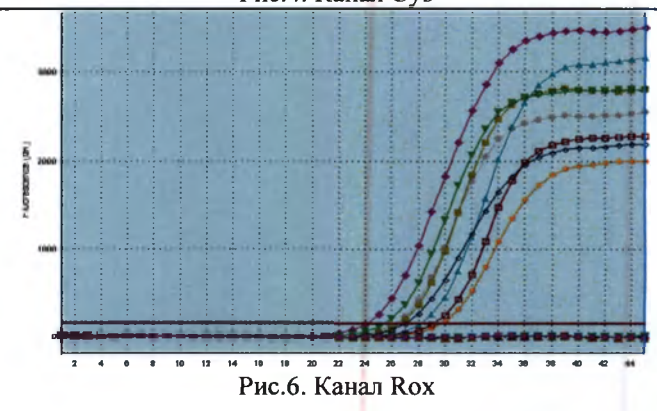


Рис.6. Канал Rox

III. Анализ результатов

Well	Dye	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
C3	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C3	ROX	Unknown	150.000	No Ct
C3	JOE	Unknown	150.000	31.99
C3	FAM	Unknown	150.000	17.08
C4	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C4	ROX	Unknown	150.000	No Ct
C4	JOE	Unknown	150.000	27.46
C4	FAM	Unknown	150.000	17.90
C5	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C5	ROX	Unknown	150.000	No Ct
C5	JOE	Unknown	150.000	30.62
C5	FAM	Unknown	150.000	21.76
C6	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C6	ROX	Unknown	150.000	No Ct
C6	JOE	Unknown	150.000	27.51
C6	FAM	Unknown	150.000	21.74
C7	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C7	ROX	Unknown	150.000	No Ct
C7	JOE	Unknown	150.000	33.71
C7	FAM	Unknown	150.000	24.81
C8	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C8	ROX	Unknown	150.000	34.02
C8	JOE	Unknown	150.000	31.48
C8	FAM	Unknown	150.000	21.38
C9	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C9	ROX	Unknown	150.000	No Ct
C9	JOE	Unknown	150.000	33.53
C9	FAM	Unknown	150.000	21.08
C10	CY5	Unknown	150.000	No Ct
C10	ROX	Unknown	150.000	No Ct
C10	JOE	Unknown	150.000	32.54
C10	FAM	Unknown	150.000	21.41
D3	CY5	Unknown	150.000	No Ct
D3	ROX	Unknown	150.000	No Ct

Рис.9. Окно «Text Report», все данные сортированы по имени лунки (“Well”)по возрастанию.

АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Tumр FRT

Дата: Прибор: Описание:

Качественный анализ

Количественный анализ

Внутренняя калибровка (калибры в текущей постановке)

Внешняя калибровка (задайте параметры К и В)

Очистить таблицу

Обозначить неподключенные

Имя образца	GLOB Fam/Green	ВПЧ16 Joe/Yellow	ВПЧ18 Rox/Orange	ВПЧ51 Cyt/Red
K1	71756	42360	26498	125188
K2	8400	343	1200	1347
K3	913	47	46	139

Well	Обозначение	Fam Green (dR)	Joe Yellow (dR)	Rox Orange (dR)	Cyt Red (dR)	Результаты							
	Name					Филогенетическая группа	Кач.	кол-во клеток	Ig ВПЧ А6/ 10 ⁵ клеток	Ig ВПЧ А7/ 10 ⁵ клеток	Ig ВПЧ А5А6/ 10 ⁵ клеток	СУММ Ig ВПЧ/ 10 ⁵ клеток	Клиническая значимость
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													

Рис.10. программа «AmpliSens FRT HR HPV Screen Quant Results Matrix.xls»

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 60 листов

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В.Г.Акимкин

