

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов одновременного выявления и количественного определения ДНК грибов рода *Candida* (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] ФлороЦеноз / Кандиды-FL»

Формат FRT

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	5
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай).	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	18
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», РОССИЯ)	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
ВПЧ ВКР	- вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
В–	- отрицательный контроль экстракции
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
CND1, CND2	- ДНК-калибраторы
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для одновременного выявления и количественного определения ДНК грибов рода *Candida* (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 6000 (пятиканальный, шестиканальный) (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (пятиканальный, шестиканальный) (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай),
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Соответствие названий каналов для флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6GYellow/Cy3
канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red
канал для флуорофора Cy5.5	Cy5.5/Crimson/Quasar705

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционной смеси согласно инструкции к набору реагентов.

Для экстракции ДНК из клинического материала необходимо использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Недопустимо использование комплекта реагентов «ЭДЭМ» и других экспресс-методов экстракции ДНК.

При работе с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q рекомендуется использование тонкостенные пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через крышку пробирки).

Для работы с прибором Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q следует использовать русифицированную программу Rotor-Gene 6000 версии 1.8.17.5 (или выше) или программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

А. Создание шаблона для проведения амплификации и детекции

А1. Для Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q с русскоязычным интерфейсом программы

1. Для создания шаблона следует выбрать в окне **Новый тест** режим **Детальный мастер**. Выбрать любой шаблон (например, **Двухшаговый цикл**) для редактирования и нажать кнопку **Новый**.
2. В следующем окне выбрать тип ротора: **36-луночный ротор**. Установить галочку в строке **Кольцо закреплено**.
3. В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси, равный **25** в строке **Объем реакции**. Установить галочку в боксе в строке **15 µL с добав. воска** чтобы активировать эту опцию.
4. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Редактор профиля** и задать параметры амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5
	60	20 с	
	72	15 с	
3	95	5 с	40
	60	20 с *детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается на втором шаге (60 °C) второго блока циклирования (Детек. на **Cycling A / Acquiring to Cycling A**) по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** и **Cy5.5/Crimson**.

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

Задав программу амплификации и детекции, нажать кнопку **ОК**.

- Задать автоматическую калибровку для выбора параметра **Уровень сигнала**. Для этого в окне **Установки каналов** нажать кнопку **Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне **Авто-оптимизация уровня сигнала** нажать кнопку **Опт. Детек-мых**. В строке **Нужный диапазон стартового сигнала** для канала **FAM/Green** нужно указать минимальный сигнал – **5**, а максимальный сигнал – **10**. Для каналов **JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** и **Cy5.5/Crimson** нужно указать минимальный сигнал – **4**, а максимальный сигнал – **8**. В графе **Позиция пробирки** должен быть указан номер пробирки – **1**, по сигналу которой будет автоматически выбран параметр **Уровень сигнала**. Поставить галочкой бокс в строке **Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Закрыть окно **Авто-оптимизация уровня сигнала**.
- Перейти в следующее окно. Сохранить запрограммированный шаблон выполнения теста. Для этого нажать кнопку **Сохранить шаблон**. Задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации. Сохранить файл в предлагаемую папку: **Templates\Quick Start Templates**; закрыть окно **Мастер Нового Теста**. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне **Новый тест**.

Запрограммированный согласно данному описанию шаблон теста можно использовать для запуска любых тестов для выявления ДНК возбудителей ИППП и др. инфекций органов репродукции с помощью комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, FRT-100 F и FRT-1000 F (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Примечание – Чтобы редактировать таблицу образцов до старта выполнения программы теста, необходимо выбрать в меню **Файл** подменю **Предпочтения** и в открывшемся окне (вкладка **Установки пользователя** пункт **Опции редактирования образцов**) выбрать пункт **Редактировать образцы перед стартом теста**.

A2. Для Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q с англоязычным интерфейсом программы

1. Для программирования и создания шаблона следует выбрать в окне **New Run** режим программирования **Advanced**. Выбрать любой шаблон (например, **Hydrolysis probes / Dual Labeled Probe**) для редактирования и нажать кнопку **New**. В следующем окне выбрать тип ротора **36-Well Rotor**. Установить галочку в строке **No Domed Tubes / Locking Ring Attached**.
2. В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси **Reaction Volume (µL)**, равный **25**, после чего необходимо установить галочку в боксе в строке **15 µL oil layer volume**, чтобы активировать эту опцию.
3. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile** и задать параметры амплификации.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5
	60	20 с	
	72	15 с	
3	95	5 с	40
	60	20 с *детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с	

Acquiring – детекция флуоресценции назначается на втором шаге (60 °C) второго блока циклирования (**Acquiring to Cycling A**) по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** и **Cy5.5/Crimson** Задав программу амплификации и детекции, нажать кнопку **OK**.

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

4. Задать автоматическую калибровку для выбора параметра **gain**. Для этого в окне **Channel Setup** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation**. В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup** нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimize Acquiring**. Для канала **FAM/Green** нужно указать в графе **Min Reading** значение **5**, а в графе **Max Reading** значение **10**. Для каналов **JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** и **Cy5.5/Crimson** нужно указать в графе **Min Reading** значение **4**, а в графе **Max Reading** – значение **8**. В графе **Tube position** должен быть указан номер пробирки – **1**, по сигналу которой будет автоматически выбран параметр **Gain**. Поставить галочку в боксе в строке **Perform Calibration Before 1-st Acquisition/Perform Optimisation Before 1-st Acquisition**. Закрыть окно **Auto Gain Calibration Setup**.
5. Перейти в следующее окно. Сохранить запрограммированный шаблон выполнения теста, нажав кнопку **Save Template**. Задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации. Сохранить файл в предлагаемую папку: **Templates** (и в ней в папку **Quick Start Templates**) и закрыть окно **New Run Wizard**. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне **New Run**.

Запрограммированный таким образом шаблон «АмплиСенс-1» можно использовать для проведения амплификации и детекции при проведении любых тестов для выявления ДНК возбудителей ИППП с помощью комплектов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Б. Проведение амплификации и детекции с использованием готового шаблона

Б1. Для Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q с русскоязычным интерфейсом программы

1. Установить пробирки в ротор. При этом в первой позиции должна быть установлена одна из подготовленных для анализа пробирок с реакционной смесью (см. примечание 1 и 2). Установить фиксирующее кольцо, прикрепить ротор, совместив отверстие для фиксатора с фиксатором, закрыть крышку прибора.

2. Для запуска с использованием готового шаблона выбрать в меню **Новый**, вверху окна **Новый тест** выбрать вкладку **Детальный мастер**, затем в списке шаблонов в этом окне выбрать нужный шаблон с программой амплификации и детекции «**АмплиСенс-1**» (запрограммированный согласно описанию в разделе **A1 Создание шаблона**).
3. В окне выбора ротора выбрать тип ротора: **36-луночный ротор** или **72-луночный ротор**. Поставить галочку в боксе **Кольцо закреплено**. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Далее**.
4. В следующем окне нужно проверить, что указан объем реакционной смеси **Объем реакции** равный **25** и в боксе **15 µL с добав. воска** установлена галочка, активирующая эту опцию.
5. В окне таблицы образцов задать последовательность расположения образцов в роторе, указав для каждого образца его имя (идентификатор) и для всех образцов тип **Образец**. Нажать кнопку **ОК**. Отредактировать таблицу образцов можно также после старта выполнения программы амплификации.

Примечание – Для редактирования таблицы образцов до старта нужно, чтобы предварительно в меню **Файл** подменю **Предпочтения** был выбран пункт **Редактировать образцы перед стартом теста**.

6. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий авто-оптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне, в соответствии с разделом А. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Далее**.
7. В последнем перед стартом окне запустить выполнение программы прибором с помощью кнопки **Старт** в нижней части окна. При этом ротор должен быть уже прикреплен и крышка прибора закрыта. Задать имя файла, в котором будут сохранены результаты, и нажать кнопку **Сохранить**.
8. После окончания выполнения программы амплификации можно приступить к интерпретации результатов.

ВНИМАНИЕ! После окончания выполнения программы амплификации пробирки удаляются из ротора и утилизируются.

Примечания:

1. **Первая пробирка в роторе** используется для автоматической оптимизации уровня сигнала, поэтому в 1-ой позиции в роторе должна находиться пробирка с реакционной смесью. При одновременном проведении тестов с использованием наборов серии «МУЛЬТИПРАЙМ» в 1-ую позицию в роторе необходимо

помещать пробирку с реакционной смесью набора реагентов, для которого используется максимальное число каналов.

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

Б2. Для Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q с англоязычным интерфейсом программы

1. Установить пробирки в ротор. При этом в первой позиции должна быть установлена одна из подготовленных для анализа пробирок с реакционной смесью (см. примечание 1 и 2 в разделе Б1). Установить фиксирующее кольцо, прикрепить ротор, совместив отверстие для фиксатора с фиксатором, закрыть крышку прибора.
2. Для запуска с использованием готового шаблона выбрать в меню **New Run**, вверху окна **New Run Wizard** выбрать вкладку **Advanced**. В списке шаблонов в этом окне выбрать нужный шаблон с программой амплификации и детекции «**АмплиСенс-1**» (запрограммированный согласно описанию в разделе **A2 Создание шаблона**).
3. В окне выбора ротора выбрать тип используемого ротора: **36-Well Rotor** или **72-Well Rotor** (соответственно, 36-луночный или 72-луночный). Установить галочку в строке **Locking Ring Attached**. Перейти в следующее окно.
4. В следующем окне можно проверить правильность указания объема реакционной смеси, а при работе с Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q проверить, что в боксе **15 μ L oil layer volume** установлена галочка, активирующая эту опцию. Перейти в следующее окно.
5. В следующем окне можно проверить правильность программы амплификации и детекции и условий авто-оптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне (в соответствии с описанием в разделе «Создание шаблона»).
6. В последнем перед стартом окне запустить программу с помощью кнопки **Start** в нижней части окна. При этом ротор должен быть уже прикреплен и крышка прибора закрыта. Задать имя файла, в котором будут сохранены результаты, и нажать кнопку **Save**.
7. В окне таблицы образцов задать последовательность расположения образцов в роторе, указав для каждого образца его имя (идентификатор) и тип **Unknown**. Нажать кнопку **OK**.

Примечание – Можно редактировать таблицу образцов до старта. Для этого нужно предварительно в меню **File**, подменю **User preferences** выбрать пункт **Edit Samples Before Run Started**.

8. После окончания выполнения программы амплификации можно приступить к интерпретации результатов.

ВНИМАНИЕ! После окончания выполнения программы амплификации пробирки удаляют из ротора и утилизируют.

В. Анализ и интерпретация результатов

В1. Анализ результатов реакции амплификации

Анализ результатов выполняется отдельно (последовательно) для каждого канала флуоресцентной детекции, в соответствии с инструкцией к набору реагентов и описанием в данном разделе. Далее расчет концентраций и интерпретацию полученных результатов можно проводить вручную или в автоматическом режиме с использованием шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.

Анализируют графики накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

- по каналу **FAM/Green** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.albicans***;
- по каналу **JOE/Yellow** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.glabrata***;
- по каналу **ROX/Orange** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.krusei***;
- по каналу **Cy5/Red** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ***C.parapsilosis* и/или *C.tropicalis***;
- по каналу **Cy5.5/Crimson** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК **внутреннего контроля (ВКО-FL)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* ДНК-калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК обнаруженного вида ***Candida spp.***

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов (стандартов) CND1 и CND2

указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

В1.1 Порядок анализа результатов для Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q с русскоязычным интерфейсом программы

1. Проверить, что в таблице образцов обозначены ДНК-калибраторы (тип – **Стандарт**) и заданы их концентрации, указанные во вкладыше к набору.
2. Выбрать в главном меню значок меню **Анализ**, в ниспадающем меню выбрать вкладку **Количественный**. Выбрать нужный канал в списке в появившемся окне и нажать **Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии (для этого в окне **Вычислить порог автоматически** щелчком кнопкой мыши убрать галочку в строке **Показывать автоматически, когда открываете новый канал** и нажать кнопку **Отменить**).
4. В меню основного окна **Количественный анализ** (над графиками) должны быть включены кнопки **Динамич. фон** и **Коррект. уклона**.
5. В меню **Вычисление СТ** (в правой части окна под таблицей образцов) установить уровень пороговой линии **Порог**, равный **0,1**.
6. Нажать кнопку **Устранение выбросов** и ввести в текстовом поле значение **Порога фона** в соответствии с таблицей 1: от **20** до **30** % для канала **Cy5.5/Crimson** и от **10** до **20**% для всех остальных каналов.
7. В таблице результатов **Количественные Результаты** появятся значения **Ct** и значения рассчитанных концентраций (в столбце **Расч. Конц.**).
8. Для отрицательных контрольных образцов результаты должны соответствовать данным, указанным в табл. 2: для отрицательного контроля ПЦР (**К-**) должны отсутствовать значения **Ct** по всем каналам, для отрицательного контроля экстракции (**В-**) должны отсутствовать значения **Ct** по всем каналам, кроме канала **Cy5.5/Crimson**, по которому должно быть получено значение **Ct**, не превышающее граничного значения **35**.
9. Для ДНК-калибратора **CND2** должны быть определены значения **Ct** по четырем каналам (кроме **Crimson**), не превышающие граничного значения **33**.
10. Показатель эффективности амплификации **Эффективность** в окне графика стандартов по каждому каналу должен находиться в пределах **0,8 – 1,2** ($1,0 \pm 0,2$).

Параметры анализа результатов

Канал флуоресценции	Детектируемая ДНК-мишень	Порог/ Threshold	Порог Фона/ NTC Threshold/	Коррект. уклона / Slope Correct
Green	ДНК <i>C.albicans</i>	0,1	10-20 %	включена
Yellow	ДНК <i>C.glabrata</i>	0,1	10-20 %	включена
Orange	ДНК <i>C.krusei</i>	0,1	10-20 %	включена
Red	ДНК <i>C.parapsilosis</i> и <i>C.tropicalis</i>	0,1	10-20 %	включена
Crimson	ДНК ВКО	0,1	20-30 %	включена

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Ct по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	Ct по каналу Cy5.5/Crimson
В-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение < 35
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
CND2	ПЦР	Определено значение < 33	не оценивается

В1.2 Порядок анализа результатов для Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q с англоязычным интерфейсом программы

1. Проверить, что в таблице образцов обозначены ДНК-калибраторы (тип **Standard**) и заданы их концентрации, указанные во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.
2. Выбрать в главном меню значок меню **Analysis**, в выпадающем меню выбрать вкладку **Quantitation**. Выбрать нужный канал в списке в появившемся окне и нажать кнопку **Show**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии (для этого в окне **Calculate automatic threshold** щелчком кнопкой мыши убрать галочку в строке **Show automatically when opening a new channel** и нажать кнопку **Cancel**).
4. В меню основного окна **Quantitation analysis** (над графиками) должны быть включены кнопки **Dynamic tube** и **Slope Correct**.
5. В меню **CT Calculation** (в правой части окна под таблицей образцов) установить уровень пороговой линии **Threshold**, равный **0,1**.

6. Нажать кнопку **Outlier Removal** и ввести в текстовом поле значение в соответствии с таблицей 1: от **20** до **30** % для канала **Crimson** и от **10** до **20** % для всех остальных каналов.
7. В таблице результатов **Quantitation Results** появятся значения *Ct* и значения рассчитанных концентраций (в столбце **Calc Conc.**)
8. Для отрицательных контрольных образцов результаты должны соответствовать данным, указанным в табл. 2 (см. выше): для отрицательного контроля ПЦР (**K-**) должны отсутствовать значения *Ct* по всем каналам, для отрицательном контроле экстракции (**B-**) должны отсутствовать значения *Ct* по всем каналам, кроме канала **Cy5.5/Crimson**, по которому должно быть получено значение *Ct*, не превышающее граничного значения **35**.
9. Для ДНК-калибратора **CND2** должны быть определены значения *Ct* по четырем каналам (кроме **Cy5.5/Crimson**), не превышающие граничного значения **33**.
10. Показатель эффективности амплификации **Efficiency** в окне графика стандартов **Standard Curve** по каждому каналу должен находиться в пределах **0,8 – 1,2** ($1,0 \pm 0,2$).

В2. Интерпретация результатов

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК и ДНК-калибратора CND2, в соответствии с таблицей оценки результатов контролей (см. табл. 2). В противном случае – см. раздел В3 «Возможные ошибки».

Для исследуемого образца, в котором не обнаружена ДНК анализируемых видов *Candida* или полученное число копий ДНК составляет менее 100, результат считается достоверным, только если для этого образца определено значение *Ct* по каналу **Cy5.5/Crimson** (каналу для детекции результатов амплификации ДНК ВКО), не превышающее граничного значения 35.

Полученные значения количества копий ДНК-мишени в таблице результатов для определенного канала используются для расчета количества геномных эквивалентов соответствующего этому каналу (см. табл. 1) вида *Candida*, содержащихся в 1 мл исходного клинического образца по формуле:

$$\text{[Число геномных эквивалентов] на 1 мл (ГЭ/мл)} = K \times \text{[Число копий] ДНК } \textit{Candida}$$

ВНИМАНИЕ! Коэффициент **K** для расчета результата в ГЭ/мл указан во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Если полученное значение составляет более 2×10^5 ГЭ/мл, то указывается результат «более 2×10^5 ГЭ/мл», если полученное значение составляет менее 200 ГЭ/мл, то указывается результат «менее 200 ГЭ/мл» (с учетом линейного диапазона набора). Если полученное значение составляет менее 10 ГЭ/мл, то указывается результат «не обнаружено».

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

Расчет результатов рекомендуется проводить с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel. Для получения результатов необходимо:

- внести данные из вкладыша к набору реагентов в таблицу в разделе «Вкладыш к набору реагентов»;
- заполнить нужные графы в разделе **Информация о постановке**;
- скопировать названия образцов и вставить их в соответствующую графу «Обозначение образца» в разделе **Данные прибора**;
- последовательно скопировать и вставить в соответствующую графу в разделе «Данные прибора» значения **Ct** для каждого из пяти анализируемых каналов;
- нажать кнопку **Рассчитать**, после чего в соответствующих графах таблицы автоматически появятся:
 - 1) статус калибровки,
 - 2) концентрации ДНК выявленных видов *Candida* spp. (ГЭ/мл),
 - 3) статус образцов,
 - 4) результат для каждого образца и его расшифровка.

Результаты интерпретируются как достоверные, если результаты для контрольных образцов соответствуют требуемым (см. табл. 2). Пример интерпретации результатов представлен в табл. 3.

Пример интерпретации результатов

Имя	Результат	Комментарий
1	Не обнаружена ДНК анализируемых видов <i>Candida</i>	<i>Ct</i> по каналу Cy5.5/Crimson <35, т.о. результат валидный
2	Обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> 6x10 ³ ГЭ/мл	–
3	Обнаружена ДНК <i>Candida glabrata</i> 700 ГЭ/мл, обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> менее 200 ГЭ/мл	–
4	Обнаружена ДНК <i>Candida parapsilosis</i> и/или <i>Candida tropicalis</i> 320 ГЭ/мл	–
5	Невалидный результат	Отсутствует <i>Ct</i> по каналу Crimson и содержание ДНК <i>Candida</i> – менее 100 копий

В3. Возможные ошибки

Результат количественного ПЦР-исследования считается недостоверным в следующих случаях:

1. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (**B–**) и/или отрицательного контроля ПЦР (**K–**) регистрируется значение порогового цикла **Ct** по каналам **FAM/Green** и/или **JOE/Yellow** и/или **ROX/Orange** и/или **Cy5/Red**. В этом случае необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла (значение концентрации), соответственно, по каналам **FAM/Green** и/или **JOE/Yellow** и/или **ROX/Orange** и/или **Cy5/Red**.
2. Если для ДНК-калибратора **CND2** значения порогового цикла **Ct** по каналам **FAM/Green** и/или **JOE/Yellow** и/или **ROX/Orange** и/или **Cy5/Red** отсутствуют или превышают граничное значение **33**, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
3. Если показатель **Эффективность/Efficiency** в окне **График станд./Standard Curve** менее **0,8** или более **1,2**, необходимо проверить правильность указанных концентраций ДНК-калибраторов, в соответствии с вкладышем, прилагаемом к набору реагентов. Если при правильных концентрациях калибраторов показатель эффективности не входит в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию для всех образцов и калибраторов.
4. Если для **исследуемого образца** полученное число копий ДНК *Candida* spp. составляет от 0 до 100, а по каналу **Cy5.5/Crimson** значение **Ct** отсутствует или превышает граничное значение **35**, необходимо повторно провести анализ для данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При работе с прибором CFX96 рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

А. Программирование амплификатора

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

Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать пункт **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 30** мкл.

Программа «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5
	60	20 с	
	72	15 с	
3	95	5 с	40
	60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с	

Детекция флуоресценции назначается на втором шаге (60 °C) второго блока циклирования по каналам **FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705**.

ВНИМАНИЕ: Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options** задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. 1). Нажать **OK**.

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

Программа «АмплиСенс-1» является **универсальной** для проведения амплификации и детекции при использовании комплектов реагентов «ПЦР-комплект» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для выявления ДНК возбудителей ИППП. Поэтому можно одновременно в одном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание, включая все тесты для выявления и генотипирования вирусов папилломы человека (ВПЧ ВКР) с помощью комплектов реагентов «ПЦР-комплект» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

- В следующем окне (модуль **Plate**) задать схему планшета – указать расположение образцов в реакционном блоке и назначить детекцию флуоресценции по пяти каналам **FAM, HEX, ROX, Cy5** и **Quasar705** для всех образцов. Для этого с помощью кнопки **Select Fluorophores...** выбрать (отметить галочками) нужные флуорофоры в списке. Для всех проб ДНК из клинических образцов и отрицательных контролей в поле **Sample type** выбрать **Unknown**. Указать идентификаторы образцов в поле **Sample name**. Для ДНК-калибраторов **CND1** и **CND2** для всех каналов обозначить **Sample type – Standard** и указать их концентрацию в поле **Concentration** в соответствии с вкладышем к набору реагентов. Сохранить файл схемы планшета, нажать кнопку **OK**.
- Открыть крышку прибора с помощью кнопки **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с заданной схемой планшета. Закрыть крышку прибора кнопкой **Close Lid**.

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

5. Запустить выполнение выбранной программы «**АмплиСенс-1**» с заданной схемой планшета, нажав кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Использование готового шаблона для проведения теста

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

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

Б. Анализ и интерпретация результатов

Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения прибора **CFX96**. Далее расчет концентраций и интерпретацию полученных результатов можно проводить вручную или в автоматическом режиме с использованием шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.

Анализируют графики накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

- по каналу **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.albicans***;
- по каналу **HEX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.glabrata***;
- по каналу **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.krusei***;
- по каналу **Cy5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ***C.parapsilosis*** и/или ***C.tropicalis***;
- по каналу **Quasar705** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК **внутреннего контроля (ВКО-FL)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *Ct* (*Cq*) в соответствующей графе

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2001-1-12; Форма 2: **REF** R-F5-100-FT(RG,CFX); **REF** H-2002-1-1 /

таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* (*Cq*) ДНК-калибраторов программа автоматически производит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК соответствующих видов *Candida*.

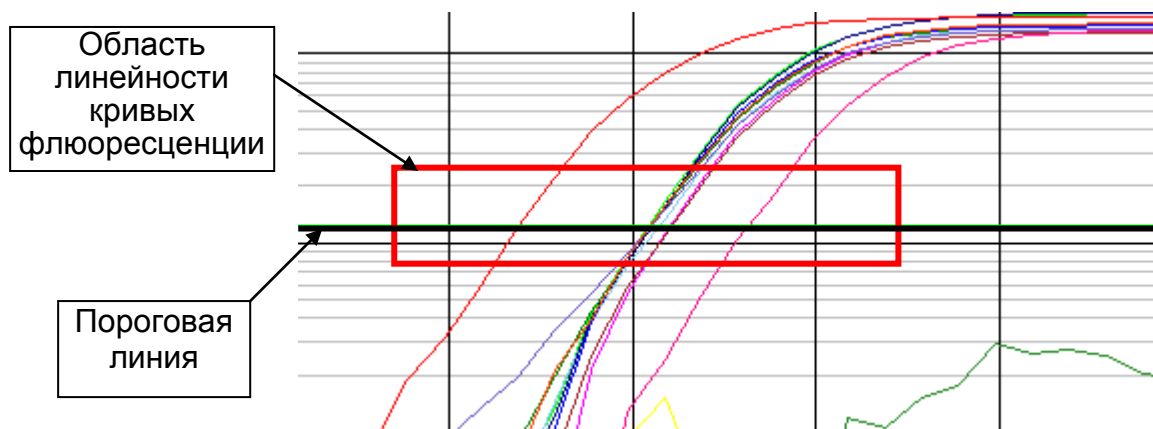
Расчет концентрации ДНК обнаруженного вида *Candida* в ГЭ/мл производится по формуле:

$$\text{[Число геномных эквивалентов] на 1 мл} = K \times \text{[Число копий] ДНК } \textit{Candida}$$

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов (стандартов) и значение коэффициента *K* для расчета окончательных результатов в ГЭ/мл указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Б1. Порядок анализа результатов

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать файл данных.
2. Проанализировать данные отдельно по каждому каналу, выключив все остальные каналы (сняв галочку в боксе с обозначением канала под основным окном с графиками **Amplification**).
3. Для каждого канала установить пороговую линию так, чтобы она пересекала графики накопления флуоресцентного сигнала только на участке характерного экспоненциального подъема и не пересекала базовую линию. В случае если автоматически выбранный уровень пороговой линии не соответствует этому требованию, следует повысить уровень порога. При выборе порога следует переключиться на логарифмическую шкалу (нажав кнопку **Log View**) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где графики флуоресценции ДНК-калибраторов имеют линейный характер, выше флуктуаций базовой линии. Иначе определить уровень, на котором устанавливается пороговая линия, можно в диапазоне от 10 до 20 % от максимального уровня сигнала по графику образца ДНК-калибратора CND1 в последнем цикле амплификации (выключив логарифмическую шкалу) для каждого канала, кроме канала для флуорофора Cy5.5. По каналу для флуорофора Cy5.5, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образца В–.



4. В таблице результатов появятся значения пороговых циклов **Cq** и рассчитанные концентрации **SQ** для анализируемого канала.
5. Для отрицательных контрольных образцов результаты должны соответствовать данным, приведенным в табл. 2 (см. выше): для отрицательного контроля ПЦР (**K-**) должны отсутствовать значения **Cq** по всем каналам, для отрицательного контроля экстракции (**B-**) должны отсутствовать значения **Cq** по всем каналам, кроме канала **Quasar705**, по которому должно быть получено значение **Cq**, не превышающее граничного значения **37**.
6. Для ДНК-калибратора **CND2** должны быть определены значения **Cq** по четырем каналам (кроме **Quasar705**), не превышающие граничного значения **36**.
7. Показатель эффективности амплификации **E** в окне графика стандартов **Standard Curve** по каждому каналу должен находиться в пределах **80 – 120%**.

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Cq по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5	Cq по каналу Quasar705
B-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует (N/A)	Определено значение < 37
K-	ПЦР	Значение отсутствует (N/A)	Значение отсутствует
CND2	ПЦР	Определено значение < 36	Не оценивается

Б2. Интерпретация результатов

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК и ДНК-калибратора CND2, в соответствии с таблицей оценки результатов

контролей (см. табл. 4), и показатель эффективности амплификации **E** находится в нужном диапазоне **80-120 %**. В противном случае – см. раздел Б3 «Возможные ошибки».

Для исследуемого образца, в котором не обнаружена ДНК анализируемых видов *Candida* или полученное число копий ДНК составляет менее 100, результат считается достоверным, только если для этого образца определено значение *Ct* по каналу **Quasar705** (каналу для детекции результатов амплификации ДНК ВКО), не превышающее граничного значения **37**.

Полученные значения количества копий ДНК-мишени в таблице результатов для определенного канала используются для расчета количества геномных эквивалентов соответствующего этому каналу (см. табл. 1) вида *Candida*, содержащихся в 1 мл исходного клинического образца по формуле:

$$[\text{Число геномных эквивалентов}] \text{ на } 1 \text{ мл (ГЭ/мл)} = K \times [\text{Число копий}] \text{ ДНК } \textit{Candida}$$

ВНИМАНИЕ! Коэффициент **K** для расчета результата в ГЭ/мл указан во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Если полученное значение составляет более 2×10^5 ГЭ/мл, то указывается результат «более 2×10^5 ГЭ/мл», если полученное значение составляет менее 200 ГЭ/мл, то указывается результат «менее 200 ГЭ/мл» (с учетом линейного диапазона набора). Если полученное значение составляет менее 10 ГЭ/мл, то указывается результат «не обнаружено».

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

Расчет результатов рекомендуется проводить с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel.

Для получения результатов необходимо:

- внести данные из вкладыша к набору реагентов в таблицу в разделе «Данные из вкладыша»;
- заполнить нужные графы в разделе **Информация о постановке**;
- скопировать названия образцов и вставить их в соответствующую графу (столбец) «Обозначение образца» в разделе «Данные прибора»;
- последовательно скопировать и вставить в соответствующую графу в разделе «Данные прибора» значения *Ct* для каждого из пяти анализируемых каналов;

Формат FRT Форма 1: REF H-2001-1-12; **Форма 2:** REF R-F5-100-FT(RG,CFX); REF H-2002-1-1 /

— нажать кнопку **Рассчитать**, после чего в соответствующих графах таблицы автоматически появятся:

- 1) статус калибровки,
- 2) концентрации ДНК выявленных видов *Candida* spp. (ГЭ/мл),
- 3) статус образцов,
- 4) результат для каждого образца и его расшифровка.

Результаты интерпретируются как достоверные, если результаты для контрольных образцов соответствуют требуемым (см. табл. 4). Пример интерпретации результатов представлен в табл. 5.

Таблица 5

Пример интерпретации результатов

Имя	Результат	Комментарий
1	Не обнаружена ДНК анализируемых видов <i>Candida</i> spp.	Cq по каналу Quasar705 <37, т.о. результат валидный
2	Обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> 6x10 ³ ГЭ/мл	—
3	Обнаружена ДНК <i>Candida glabrata</i> 7x10 ² ГЭ/мл, обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> менее 200 ГЭ/мл	—
4	Обнаружена ДНК <i>Candida parapsilosis</i> и/или <i>Candida tropicalis</i> 3x10 ² ГЭ/мл	—
5	Невалидный результат	Отсутствует Cq по каналу Quasar705 и содержание ДНК <i>Candida</i> – менее 100 копий

Б3. Возможные ошибки

Результат количественного ПЦР-исследования считается недостоверным в следующих случаях:

1. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (**В-**) и/или отрицательного контроля ПЦР (**К-**) регистрируется значение порогового цикла *Ct* по каналам **FAM** и/или **HEX** и/или **ROX** и/или **Cy5**, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла (значение концентрации), соответственно, по каналам **FAM** и/или **HEX** и/или **ROX** и/или **Cy5**.
2. Если для ДНК-калибратора **CND2** значения порогового цикла **Cq** по каналам **FAM** и/или **HEX**, и/или **ROX**, и/или **Cy5** отсутствуют или превышают граничное значение **36**, необходимо повторить амплификацию для всех образцов и калибраторов.
3. Если показатель эффективности **E** в окне **Standard Curve** – менее **80 %** или более **120 %**, необходимо проверить правильность указанных концентраций ДНК-калибраторов, в соответствии с вкладышем к набору, и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильных концентрациях калибраторов и

уровне пороговой линии показатель эффективности не входит в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию для всех образцов и калибраторов.

4. Если для **исследуемого образца** полученное число копий ДНК *Candida* spp. составляет от 0 до 100, а по каналу **Quasar705** значение *Ct* отсутствует или превышает граничное значение **37**, необходимо повторно провести анализ для данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия)

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

А. Программирование амплификатора

1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.

Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста – **«АмплиСенс-1»** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип – качественный;**
 - **Метод – Пороговый (Ct);**
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец** (включая клинические образцы, ОК);
 - **Контроли** – положительные – **2** (калибраторы CND1, CND2); отрицательные – **1** (К–);
 - **Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл;**
 - **Флуорофоры** – **Fam; Hex; Rox, Cy5 – специфика, Cy5.5 – ВКО;**
 - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Программа «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5
	60	20 с	
	72	15 с	
3	95	5 с	40
	60	30 с *детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с	

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2001-1-12; Форма 2: **REF** R-F5-100-FT(RG,CFX); **REF** H-2002-1-1 /

VER 04.10.21 / стр. 26 из 32

*Детекция флуоресценции назначается на втором шаге (60 °С) второго блока циклирования по каналам **Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5**.

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**АмплиСенс-1**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. Указать **Объем рабочей смеси** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. Выбрать закладку **Запуск программы амплификации**, проверить параметры теста. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.
7. Последовательно нажать кнопки **Закрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Использование готового шаблонного файла для проведения теста

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

- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**АмплиСенс-1**», указать количество образцов, нажать **ОК**;
- присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**;
- в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

Б. Анализ и интерпретация результатов

Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». Далее расчет концентраций проводится в автоматическом режиме с использованием шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.


Анализируют графики накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

- по каналу **Fam** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.albicans***;
- по каналу **Hex** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.glabrata***;
- по каналу **Rox** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.krusei***;
- по каналу **Cy5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ***C.parapsilosis* и/или *C.tropicalis***;
- по каналу **Cy5.5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК **внутреннего контроля (ВКО-FL)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* ДНК-калибраторов программа автоматически производит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК соответствующих видов *Candida*.

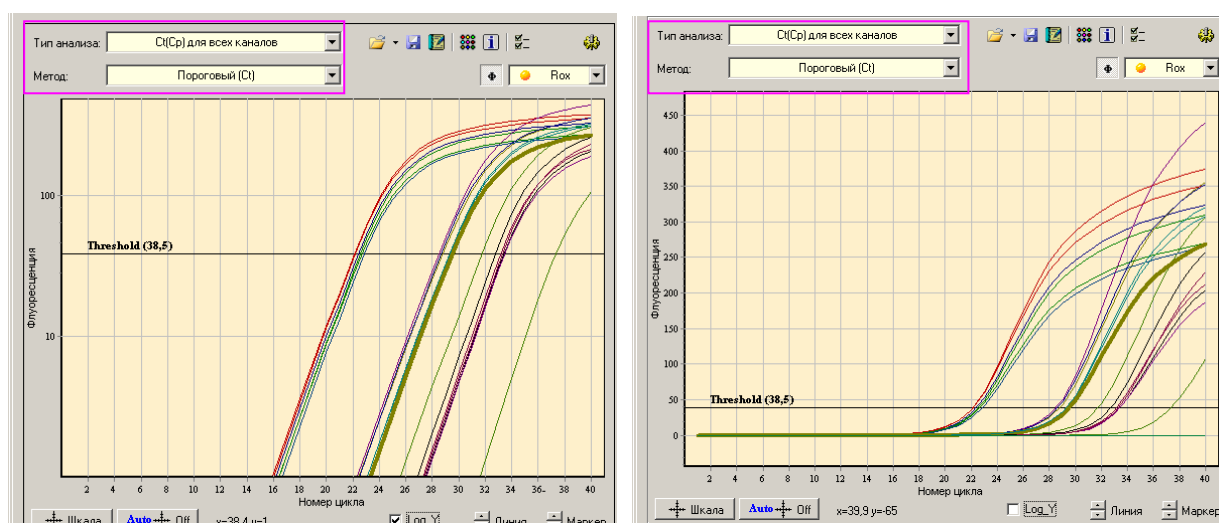
ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов (стандартов) CND1 и CND2 указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Б1 Порядок анализа результатов

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: *Ct (Cp)* для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый *Ct***.
4. Нажать кнопку Изменить параметры анализа  и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
 - Величина **Threshold – 10 StD** на участке линейного фитирования,
 - Критерии достоверности результатов: поставить галочку, **нижняя**

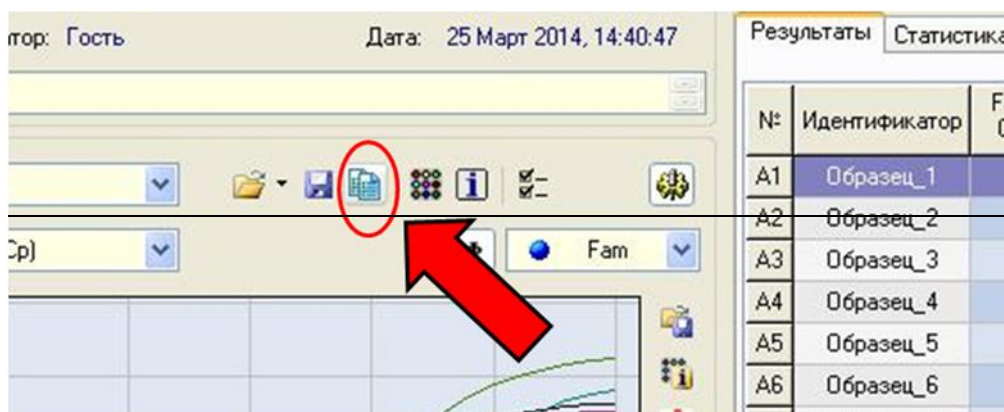
граница/порог положительного результата – 5% F (Cp), **верхняя граница/порог нормализации данных** – 30% F (Cp).

- **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует). Нажать кнопку **Применить**.
 - Включить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Ф** (нажать кнопку).
5. Для каждого из каналов **Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5** установить на нужном уровне пороговую линию (или проверить правильность автоматического выбора пороговой линии). Пороговая линия должна пересекать графики накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального роста и не пересекать графики, не имеющие характерного экспоненциального подъема (флуктуации базовой линии). Включив логарифмическую шкалу (галочкой в поле LogY), следует установить порог на таком уровне, где графики флуоресценции имеют линейный характер, выше флуктуаций базовой линии. Иначе определить уровень, на котором устанавливается пороговая линия, можно в диапазоне **от 10 до 20%** от максимального уровня сигнала по графику образца ДНК-калибратора CND1 в последнем цикле амплификации (выключив логарифмическую шкалу LogY) для каждого канала, кроме канала для флуорофора Cy5.5. По каналу для флуорофора Cy5.5, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образца В–.



6. Для копирования результатов в таблицу Excel и использования шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel нажать кнопку **Отчет по результатам**

анализа (рис. ниже). Нажать кнопку **Сохранить отчет как...**, выбрать формат ***MS Word**, выбрать папку, и присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.



Б2. Интерпретация результатов

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК и ДНК-калибратора CND2, в соответствии с таблицей оценки результатов контролей (см. табл. 6) и показатель эффективности амплификации **E** находится в нужном диапазоне **80-120 %**. В противном случае – см. раздел «Возможные ошибки».

Расчет результатов проводится с помощью шаблона расчета результатов в формате Microsoft Excel.

Для получения результатов необходимо:

- внести данные из вкладыша к набору реагентов в таблицу в разделе «Данные из вкладыша»;
- заполнить нужные графы в разделе **Информация о постановке**;
- скопировать названия образцов из файла MS Word, содержащего **Отчет по результатам анализа**, и вставить их в соответствующую графу (столбец) «Обозначение образца» в разделе «Данные прибора»;
- скопировать из файла MS Word, содержащего **Отчет по результатам анализа**, и вставить в соответствующие графы в разделе «Данные прибора» значения *Ct* для каждого из пяти анализируемых каналов;
- нажать кнопку **Рассчитать**, после чего в соответствующих графах таблицы автоматически появятся:
 - а) статус калибровки,
 - б) концентрации ДНК выявленных видов *Candida spp.* (ГЭ/мл),
 - в) статус образцов,
 - г) результат для каждого образца и его расшифровка.

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2001-1-12; Форма 2: **REF** R-F5-100-FT(RG,CFX); **REF** H-2002-1-1 /

Результаты интерпретируются как достоверные, если результаты для контрольных образцов соответствуют требуемым (табл. 6).

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Ct по каналам Fam, Hex, Rox, Cy5	Ct по каналу Cy5.5
В-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение < 37
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
CND2	ПЦР	Определено значение < 36	Не оценивается

Для исследуемого образца, в котором не обнаружена ДНК анализируемых видов *Candida* или полученное число копий ДНК составляет менее 100, результат считается достоверным, только если для этого образца определено значение Ct по каналу **Cy5.5** (каналу для детекции результатов амплификации ДНК ВКО), не превышающее граничного значения 37. Пример интерпретации результатов представлен в табл. 7.

Таблица 7

Пример интерпретации результатов

Имя	Результат	Комментарий
1	Не обнаружена ДНК анализируемых видов <i>Candida</i>	Ct по каналу Cy5.5 <37, т.о. результат валидный
2	Обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> 6x10 ³ ГЭ/мл	–
3	Обнаружена ДНК <i>Candida glabrata</i> 700 ГЭ/мл, обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> менее 200 ГЭ/мл	–
4	Обнаружена ДНК <i>Candida parapsilosis</i> и/или <i>Candida tropicalis</i> 320 ГЭ/мл	–
5	Невалидный результат	Отсутствует Ct по каналу Cy5.5 и содержание ДНК <i>Candida</i> – менее 100 копий

Полученные значения количества копий ДНК-мишени в таблице результатов для определенного канала используются для расчета количества геномных эквивалентов соответствующего этому каналу (см. табл. 1) вида *Candida*, содержащихся в 1 мл исходного клинического образца по формуле:

$$\text{[Число геномных эквивалентов] на 1 мл (ГЭ/мл)} = K \times \text{[Число копий] ДНК } \textit{Candida}$$

ВНИМАНИЕ! Коэффициент **K** для расчета результата в ГЭ/мл указан во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Если полученное значение составляет более 2x10⁵ ГЭ/мл, то указывается результат «более 2x10⁵ ГЭ/мл», если полученное значение составляет менее

200 ГЭ/мл, то указывается результат «менее 200 ГЭ/мл» (с учетом линейного диапазона набора). Если полученное значение составляет менее 10 ГЭ/мл, то указывается результат «не обнаружено».

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

Б3. Возможные ошибки

Результат количественного ПЦР-исследования считается недостоверным в следующих случаях:

1. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (**B-**) и/или отрицательного контроля ПЦР (**K-**) регистрируется значение порогового цикла **Ct** по каналам **Fam** и/или **Hex** и/или **Rox** и/или **Cy5**, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла (значение концентрации), соответственно, по каналам **Fam** и/или **Hex** и/или **Rox** и/или **Cy5**.
2. Если для ДНК-калибратора CND2 значения порогового цикла **Ct** по каналам **Fam** и/или **Hex** и/или **Rox** и/или **Cy5** отсутствуют или превышают граничное значение 36, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
3. Если показатель Эффективность/Efficiency в окне График станд./Standard Curve менее **0,8** или более **1,2**, необходимо проверить правильность указанных концентраций ДНК-калибраторов, в соответствии с вкладышем, прилагаемом к набору реагентов, и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не входит в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию для всех образцов и калибраторов.
4. Если для исследуемого образца полученное число копий ДНК *Candida spp.* составляет от 0 до 100, а по каналу **Cy5.5** значение **Ct** отсутствует или превышает граничное значение **37**, необходимо повторно провести анализ для данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.