

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс[®] *Toxoplasma gondii*-FL»

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», АВСТРАЛИЯ).....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «iQ5», «iQ iCycler» (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США).....	11

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Toxoplasma gondii*-FL» совместно с приборами для ПЦР в реальном времени:

- RotorGene 3000, RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- iCycler iQ, iQ5 (BioRad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США).

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет 4 тахизоита *Toxoplasma gondii*/мл (400 копий/мл ДНК *Toxoplasma gondii*)

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», АВСТРАЛИЯ).

Поместить микропробирки в карусель амплификатора «Rotor-Gene» 3000/6000 так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установить карусель в прибор, закрыть крышку (ячейки карусели пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

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).

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.

Программирование амплификатора:

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** или на 72 лунки **72- Well Rotor/72-луночный ротор**, и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками («Rotor-Gene» 3000) /закреплено фиксирующее кольцо («Rotor-Gene» 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл**. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 установить галочку напротив функции **25 µl oil layer volume/25 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры (см. табл. 1):

Таблица 1

Программа амплификации «АмплиСенс-1»

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа позволяет проводить исследования на нескольких тест-системах «АмплиСенс» в одном запуске прибора по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП).

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

- осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опм. Демек-мых**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - для установки калибровки всех канала нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал - 3, Max Reading/Максим. Сигнал- 8**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
 9. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
 10. Внесите данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», положительный – «К+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NegativeControl/Отрицательный контроль**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM/Green** – регистрируют накопление продукта амплификации участка **ДНК STI-87 (ВКО)**, а по другому – **JOE/Yellow** – **ДНК Toxoplasma gondii (ПКО)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов реакции амплификации ДНК Toxoplasma gondii (канал JOE/Yellow):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal.../Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
7. В отрицательном контроле (ОК) выделения – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.

8. В отрицательном контроле (К-) ПЦР – ДНК-буфер – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
9. В положительном контроле (К+) ПЦР – ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI - значение *Ct* не должно превышать **30**.
10. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие **40** циклов, считаются положительными. Если значение *Ct* в пробе превышает этот порог, то результат считается сомнительным, необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается сомнительным.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM /Green):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quantitation results/Количественные Результаты**) должны появиться значения *Ct*, не превышающие **30** циклов в каждом исследуемом образце. Пробы, в которых по каналу FAM (детекция ВКО STI-87) значение *Ct* не превышает **30** циклов, а по каналу JOE (детекция ДНК *Toxoplasma gondii*) отсутствует, считаются отрицательными. Если значение *Ct* для **ВКО STI-87** отсутствует или превышает **30**, а значение *Ct* ДНК *Toxoplasma gondii* отсутствует или превышает **40**, то результат считается невалидным, необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.
7. В отрицательном контроле выделения (ОК) – **ОКО** – значение *Ct* не должно превышать **30**.
8. В отрицательном контроле (К-) ПЦР – ДНК-буфер – не должно быть каких-либо значений *Ct*
9. В положительном контроле (К+) ПЦР – ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI – значение *Ct* не должно превышать **30**.

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения *Ct* на канале JOE/Yellow (*Toxoplasma gondii*) и/или FAM/Green (ВКО STI-87) в таблице результатов для отрицательного контроля этапа ПЦР (К-) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля (К+) ПЦР ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI по каналу JOE/Yellow отсутствует – результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов с этапа ПЦР.
3. Значения *Ct* на канале FAM/Green (внутренний контроль) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют – сбой этапа выделения. Необходимо повторить анализ для этих образцов, начиная с этапа выделения. Если для

анализируемого образца значение *Ct* ВКО превышает 30 цикл, а значение *Ct* ДНК *Toxoplasma gondii* больше 40, то необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. Высокие значения *Ct* могут быть вызваны потерями ДНК при выделении или наличием ингибиторов.

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

1. Включить прибор, запустить программу iQ5.

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

2. Поместить микропробирки или стрипы (часть плашки) или плашку в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

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

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать параметры амплификации (см. таблицу 2):

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1»

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа позволяет проводить исследования на нескольких тест-системах «АмплиСенс» в одном запуске прибора по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП).

3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как +, отрицательные контроли как -. Для всех образцов задать измерение флуоресценции по двум каналам HEX-530 и FAM-490.
6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Для запуска прибора нажать кнопку **Run** (для прибора «iQ5») или **Run with selected protocol** (для прибора «iQ iCycler»). В открывшемся окне указать объем образца **25 мкл**. Для прибора «iQ iCycler» использовать способ определения фактора лунок по экспериментальной планшете **Experimental Plate**. Для прибора «iQ5» допускается использование как режима с измерением факторов лунок по экспериментальным пробиркам, так и фиксированных факторов лунок (рекомендуется). Нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.
8. Поместить микропробирки в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

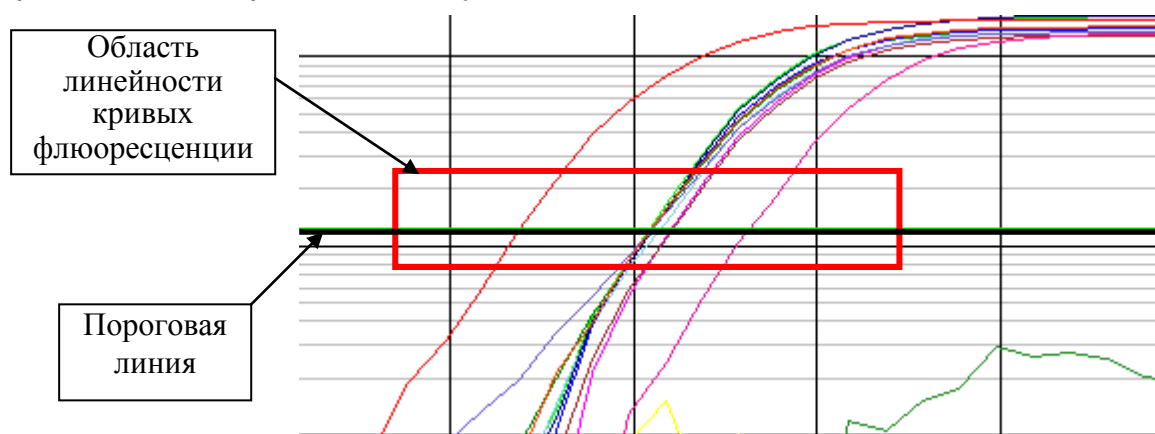
Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум

каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК STI-87 (ВКО)**, а по другому – **JOE/HEX** – **ДНК *Toxoplasma gondii* (ПКО)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Обработка данных.

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого в модуле **Workshop** нажать **Data file** и выбрать файл данных. Перейти в режим **Data Analysis**.
2. Просматривайте данные отдельно по каждому каналу.
3. 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, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговых линий (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов (см. рисунок).



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

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

Анализ результатов амплификации ДНК *Toxoplasma gondii* (канал JOE-530):

1. В таблице результатов появятся значения *Ct* для **ДНК *Toxoplasma gondii***.
2. В отрицательном контроле (ОК) выделения – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
3. В отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
4. В положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI** – значение *Ct* не должно превышать **30**.
5. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие **40** циклов, считаются положительными. Если значение *Ct* в пробе превышает этот порог, то результат считается сомнительным, необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается сомнительным.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM-490):

1. В таблице результатов (окно **Quantitation results**) должны появиться значения *Ct*, не превышающие **30** циклов в каждом исследуемом образце. Пробы, в которых по каналу FAM (детекция ВКО STI-87) значение *Ct* не превышает **30** циклов, а по каналу JOE (детекция ДНК *Toxoplasma gondii*) отсутствует, считаются отрицательными. Если значение *Ct* для **ВКО STI-87** отсутствует или превышает **30**, а значение *Ct* ДНК *Toxoplasma gondii* отсутствует или превышает **40**, то результат считается невалидным, необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.
2. В отрицательном контроле (ОК) выделения – **ОКО** – значение *Ct* не должно превышать **30**.
3. В отрицательном (К-) контроле ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
4. В положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI** – значение *Ct* не должно превышать **30**.

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения *Ct* на канале HEX-530 (*Toxoplasma gondii*) и/или FAM-490 (STI) в таблице результатов для отрицательного контроля (К-) ПЦР свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля (К+) ПЦР **ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI** *Ct* отсутствует – результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов с этапа ПЦР.
3. Значения *Ct* на канале FAM-490 (внутренний контроль) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют – сбой этапа выделения. Необходимо повторить анализ образцов, начиная с этапа выделения. Если для анализируемого образца значение *Ct* ВКО превышает 30 цикл, а значение *Ct* ДНК *Toxoplasma gondii* больше 40, то необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. Высокие значения *Ct* могут быть вызваны потерями ДНК при выделении или наличием ингибиторов.

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

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/HEX**, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр **FAM**.

ВНИМАНИЕ! Будьте внимательны! Не переворачивайте стрипы/плашку при установке в прибор.

5. Закрывать фиксатор и дверцу прибора.
6. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.
7. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью).
 - обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить два флажка **FAM** и **JOE**. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Information**). *Внести подписи образцов так же можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню Plate Setup.*
8. 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 два флажка **FAM, JOE**; далее дважды щелкая по каждой ячейке внесите подписи пробирок (Окно **Well Information**), положительный контроль обозначьте как **+**, отрицательный контроль как **-**.
9. Перейти на вкладку **Thermal Profile Setup**, задать 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 предшествующий экспериментальный файл, и откройте его. В окне **Thermal Profile** появиться необходимый профиль термоциклирования.

Самостоятельное программирование.

1. После задания всех необходимых значений и параметров, снова выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки. Перейти в меню **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации, указанную в таблице 3.

Программа амплификации «АмплиСенс-1»

Этап	Температура, °С	Продолжительность эстапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа позволяет проводить исследования на нескольких тест-системах «АмплиСенс» в одном запуске прибора по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП).

- Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data collection marker by dragging** и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.
- Запустить амплификацию, нажав кнопку **Run**, затем **Start** и присвоив имя файлу эксперимента.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК STI-87 (ВКО)**, а по другому – **JOE/HEX** – **ДНК Toxoplasma gondii (ПКО)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Обработка данных.

- Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
- На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок). В противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.
- Перейти на вкладку **Results**.
- Убедиться, что два флуоресцентных канала активны (кнопки **HEX**, **FAM** нажаты в поле **Dyes Shown** внизу окна программы).
- В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив двух флуоресцентных каналов: **JOE/HEX**, **FAM**. Проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные* кривые накопления сигнала положительных

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

образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысьте уровень порога.

Анализ результатов амплификации ДНК *Toxoplasma gondii* (канал JOE/HEX):

1. В таблице результатов появятся значения *Ct* для ДНК *Toxoplasma gondii*.
2. В отрицательном контроле (ОК) выделения – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
3. В отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
4. В положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI** – значение *Ct* не должно превышать **30**.
5. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие **40** циклов, считаются положительными. Если значение *Ct* в пробе превышает этот порог, то результат считается сомнительным, необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается сомнительным.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM):

1. В таблице результатов (окно **Quantitation results**) должны появиться значения *Ct*, не превышающие **30** циклов в каждом исследуемом образце. Пробы, в которых по каналу FAM (детекция ВКО STI-87) значение *Ct* не превышает **30** циклов, а по каналу JOE (детекция ДНК *Toxoplasma gondii*) отсутствует, считаются отрицательными. Если значение *Ct* для **ВКО STI-87** отсутствует или превышает **30**, а значение *Ct* ДНК *Toxoplasma gondii* отсутствует или превышает **40**, то результат считается невалидным, необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.
2. В отрицательном контроле (ОК) выделения – **ОКО** – значение *Ct* не должно превышать **30**.
3. В отрицательном (К-) контроле ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
4. В положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI** – значение *Ct* не должно превышать **30**.

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контроля (ОК) выделения по каналу JOE/HEX и/или для отрицательного контроля (К-) ПЦР по каналам FAM, JOE/HEX свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля (К+) ПЦР по каналам FAM, JOE/HEX отсутствует – результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов с этапа ПЦР.
3. Значения *Ct* на канале FAM (внутренний контроль) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют – сбой этапа выделения. Необходимо повторить анализ образцов, начиная с этапа выделения. Необходимо повторить анализ для этих образцов, начиная с этапа выделения. Если для анализируемого образца значение *Ct* ВКО превышает 30 цикл, а значение *Ct* ДНК *Toxoplasma gondii* больше 40, то необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. Высокие значения *Ct* могут быть вызваны потерями ДНК при выделении или наличием ингибиторов.