

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

«04» сентября 2018 г.



## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения

ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *HHV6*-скрин-титр-FL»**

**Формат FRT**

**АмплиСенс®**



Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Центральный научно-исследовательский  
институт эпидемиологии»,  
Российская Федерация, 111123,  
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) ) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) .....	6
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай) .....	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) .....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США) .....	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США) .....	19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) .....	23
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ .....	27
РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК <i>HNH6</i> .....	29

## НАЗНАЧЕНИЕ

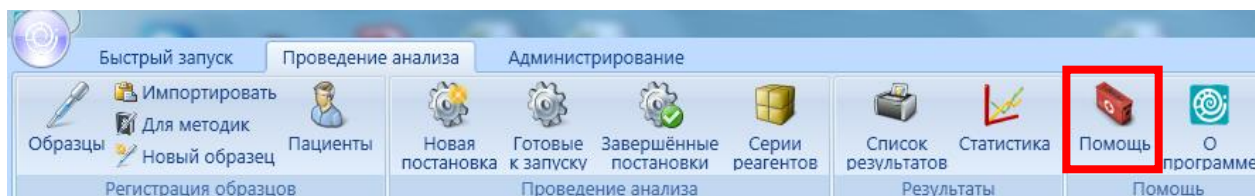
Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай),
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- Mx3000P /Mx3005P (Stratagene, США),
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

### Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

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

**ВНИМАНИЕ!** Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. **Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.**



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия) ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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









## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**ВНИМАНИЕ!** В соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008 и ГОСТ 31340-2013

следующие реагенты подлежат маркировке как содержащие опасные вещества:

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м <sup>3</sup>	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для лизиса	 Опасно (Danger)	 Опасно (Danger)	Гуанидин тиоцианат	Нет данных			
			Тритон X-100	Нет данных			
			1-Тиоглицерол	Нет данных			
Раствор для отмывки 3	 Предупреждение (Warning)	 Предупреждение (Warning)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

<sup>2</sup> Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (EC) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м <sup>3</sup>	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмывки 4	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Раствор для преципитации	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

Примечание

ПЦР-смесь-1-FRT HHV6 / Glob, OKO	Концентрация опасного вещества (натрия азид) не более 0,125% - данные реагенты не классифицируются как опасные, не подлежат маркировке опасности и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности. При работе с данными реагентами необходимо соблюдать меры предосторожности, указанные в инструкции по применению	Натрия азид	Нет данных
----------------------------------	---	-------------	------------

**ВНИМАНИЕ!** При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91.

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

### **Программирование амплификатора**

1. Включить прибор.
2. Поместить пробирки в ротор амплификатора так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установить ротор в прибор, закрыть крышку (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

**ВНИМАНИЕ!** Если вы не полностью заполняете ротор 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. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

### **Создание шаблона для проведения теста**

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**. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 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 программу амплификации.

#### Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

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..**
  - 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 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
  - в) для установки калибровки всех каналов нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал – 5**, **Max Reading/Максим. Сигнал – 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> 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. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V10-T(RG,iQ,Mx); **REF** НК1-0941-1-1;

Форма 2: **REF** R-V10-T(RG,iQ,Mx); **REF** H-0942-1-1 / **VER** 04.09.18 / стр. 7 из 30

исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «K–», положительный – «K+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC**. Для калибраторов – тип **Standard/Стандарт** и указать их концентрации в столбце **Given Conc**. Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше к набору реагентов. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

### **Анализ результатов реакции амплификации ДНК HHV6 (канал JOE/Yellow)**

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (в случае количественного анализа)
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
6. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**, а для количественных тестов – значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**).
8. В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений **Ct**.
9. В отрицательном контроле ПЦР (K–) – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений **Ct**.
10. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК HHV6 и ДНК человека** – значение **Ct** должно быть менее указанного во вкладыше, а для количественного теста расчетное значение концентрации должно укладываться в диапазон



значений, указанный во вкладыше.

11. В положительном контроле ПЦР (К+) – **KSG2** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше (качественный тест).
12. В ДНК-калибраторах – **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**) (количественный тест).

### **Анализ результатов амплификации ВКО Glob (канал FAM/Green)**

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации в случае количественного теста.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) должны появиться значения *Ct* для **ДНК ВКО Glob** в каждом исследуемом образце, а для количественных тестов – значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**). При этом значение *Ct* не должно превышать значение, указанное во вкладыше.
8. В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – значение *Ct* отсутствует.
9. В отрицательном контроле ПЦР (К-) – **РНК-буфер** – значение *Ct* отсутствует.
10. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК HNV6 и ДНК человека** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше, а для количественного теста должно быть определено значение концентрации.
11. В положительном контроле ПЦР (К+) – **KSG2** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше (качественный тест).
12. В ДНК-калибраторах – **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**) (количественный тест).

### **Интерпретация результатов**

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

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

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

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

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, 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).

1. Включить прибор, запустить программу iQ5

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

2. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

**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 стрипы 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 соответствующие параметры амплификации.

**Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа**

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	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	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

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 «–». Калибраторы по каналу **JOE/HEX** и **FAM** задать как **Standard** и указать концентрацию из

вкладыша к набору реагентов. При задании калибраторов кнопка **Whole Plate Loading** должна быть не активирована. Для всех образцов и калибраторов задать измерение флуоресценции по двум каналам JOE/HEX и FAM.

6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

### 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. Просматривать данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысить уровень порога, 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. В таблице результатов (окно **Quant. Results**) появятся значения *Ct* для анализируемого канала.
4. Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или активировав кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (iQ5).

### Анализ результатов амплификации *HHV6* (канал JOE/HEX)

Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (для количественного анализа).

1. В таблице результатов появятся значения *Ct* для **ДНК *HHV6***, а для количественных тестов – значения концентраций (copies/reaction).
2. В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
3. В отрицательном контроле ПЦР (К–) – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
4. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК *HHV6* и ДНК человека** значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше, а для количественного теста расчетное значение концентрации должно укладываться в диапазон значений, указанный во вкладыше.

5. В положительном контроле ПЦР (К+) – **KSG2** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше (качественный тест).
6. В ДНК-калибраторах – **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (количественный тест).

### **Анализ результатов амплификации ВКО Glob (канал FAM)**

Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (для количественного анализа).

1. В таблице результатов должны появиться значения *Ct* для **ДНК ВКО Glob** в каждом исследуемом образце, а для количественных тестов – значения концентраций (*copies/reaction*). При этом значение *Ct* не должно превышать значение, указанное во вкладыше.
2. В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – значение *Ct* отсутствует.
3. В отрицательном контроле ПЦР (К-) – **PHK-буфер** – значение *Ct* отсутствует.
4. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК HHV6 и ДНК человека** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше, а для количественного теста должно быть определено значение концентрации.
5. В положительном контроле ПЦР (К+) – **KSG2** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше (качественный тест).
6. В ДНК-калибраторах – **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (***Calc Conc (copies/reaction)***) (количественный тест).

### **Интерпретация результатов**

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

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

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США)

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

### Программирование амплификатора:

1. Включить прибор.

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

2. Запустить программу Stratagene Mx3000P/Mx3005P.

3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора, закрыть фиксатор и крышку 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.

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 окне **New Experiment Options** выберите пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установите флажок **Turn lamp on for warm-up**.

6. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:

а) выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью).

б) 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**.*

Калибраторы по каналу **JOE/HEX** и **FAM** задать как **Standard** и указать концентрацию из вкладыша к набору реагентов.

Перейти на вкладку **Thermal Profile Setup**, задайте программу амплификации. Для этого использовать один из следующих способов:

**Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется)**

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

**Самостоятельное программирование**

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

**Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа**

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	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	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

2. 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.
3. Запустить амплификацию, нажав кнопку **Run**, затем **Start** и присвоив имя файлу эксперимента.

**Анализ. Обработка данных**

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (для количественного анализа).
2. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
3. 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.



4. Перейти на вкладку **Results**.
5. Убедиться, что два флуоресцентных канала активны (кнопки **JOE** и **FAM** нажаты в поле **Dyes Shown** внизу окна программы).
6. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив двух флуоресцентных каналов: JOE/HEX и FAM. Проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысить уровень порога.  
  
(По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Для того чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, дважды щелкнуть левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties** для оси Y (Y axis) поставить галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**).
7. В таблице результатов появятся значения *Ct* для **ДНК HHV6** (по каналу JOE/HEX), **ДНК ВКО Glob** (по каналу FAM), а для количественных тестов – значения концентраций (copies/reaction). По каналу FAM значение *Ct* для исследуемых образцов должно быть менее указанного во вкладыше.
8. В отрицательном контроле экстракции (OK) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct* по каналам FAM и JOE/HEX.
9. В отрицательном контроле ПЦР (K-) – **PHK-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct* по каналам FAM и JOE/HEX.
10. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК HHV6 и ДНК человека** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше по всем каналам, для количественного теста расчетное значение концентрации должно укладываться в диапазон значений, указанный во вкладыше.
11. В положительном контроле ПЦР (K+) – **KSG2** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше по всем каналам (качественный тест).
12. В ДНК-калибраторах – **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (copies/reaction) по всем каналам (количественный тест).

### Интерпретация результатов

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

реагентов.

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

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

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

### Программирование амплификатора

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

### Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**).
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

### Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
3	72	15 с	–	40
	95	5 с	–	
	60	30 с	FAM, HEX	
	72	15 с	–	

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

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

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New** и ввести имя файла, нажать **Сохранить**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой во вкладке **Protocol**, нажав на кнопку **Select Existing...**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.
- Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...**. В появившемся окне **Plate Editor – New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками в колонке **Selected** все флуорофоры, используемые в данной постановке и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов, кроме ДНК-калибраторов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.  
Для ДНК-калибраторов **K1** и **K2** для всех каналов обозначить **Sample type – Standard** и указать их концентрацию в поле **Concentration** в соответствии с вкладышем к набору реагентов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New** и ввести имя файла, нажать **Сохранить**. Выбрав или отредактировав нужную схему планшета, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.
- Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

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

7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

### **Анализ результатов**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *HHV6*.

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

Поочередно для каждого канала отметить галочкой **Log Scale** и установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

3. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов и концентрации калибраторов.
4. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.
5. В таблице результатов появятся значения *Ct* для **ДНК HHV6** (по каналу JOE/HEX), **ДНК ВКО Glob** (по каналу FAM), а для количественных тестов –

- значения концентраций (copies/reaction). По каналу FAM значение  $C_t$  для исследуемых образцов должно быть менее указанного во вкладыше.
6. В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений  $C_t$  по каналам FAM и HEX.
  7. В отрицательном контроле ПЦР (К–) – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений  $C_t$  по каналам FAM и HEX.
  8. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК HNV6 и ДНК человека** – значение  $C_t$  должно быть менее указанного во вкладыше по всем каналам, для количественного теста расчетное значение концентрации должно укладываться в диапазон значений, указанный во вкладыше.
  9. В положительном контроле ПЦР (К+) – **KSG2** – значение  $C_t$  должно быть менее указанного во вкладыше по всем каналам (качественный тест).
  10. В ДНК-калибраторах – **KSG1 и KSG2** – должны появиться значения  $C_t$  и значения концентраций (copies/reaction) по всем каналам (количественный тест).

### **Интерпретация результатов**

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

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

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

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

### Программирование амплификатора

1. Включить прибор, 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** на верхней панели выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста «**АмплиСенс-1**» и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
  - **Тип** – качественный;
  - **Метод** – **Пороговый (Ct)**;
  - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль+, контроль-, стандарт**;
  - **Стандарты** – количество – 2; дубли – 2; в колонке копий указать концентрацию;
  - **Контроли**: положительный (К+) – 1; отрицательный (К-) – 1;
  - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл.
  - **Флуорофоры** – **Fam, Hex** (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать **R6G**) и **Rox** (Fam, Rox – ВК; Hex/R6G – специфика).
  - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

### Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

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

Примечание – Каналы **Су5** и **Су5.5** включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

- В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
  - Выбрать вкладку **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 открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
  - Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
- ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.
- Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

#### Использование готового шаблонного файла для проведения теста


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




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

### Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *HNV6*, ВКО STI-87 и ДНК человека.

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс)** для версии программы v.7.5. и выше).
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
  - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
  - **Критерии достоверности результата: поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 10 %, верхняя граница/порог нормализации данных – 10 %.**
  - **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).Нажать кнопку **Применить**.
5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки  $\Phi$  (отжать кнопку).**
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные

(сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log\_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

7. Для дальнейшей работы с данными можно скопировать результаты значений  $C_t$  для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета в виде файла Word нажать кнопку **Отчет по результатам анализа** . Далее выбрать галочками параметры, необходимые для отображения в отчете, нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат **«MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML»** и папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

### **Интерпретация результатов**

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

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

**ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ**

1. Наличие любого значения *Ct* по каналам FAM/Green и JOE/Yellow/HEX в таблице результатов для отрицательного контроля этапа ПЦР (К-) и отрицательного контроля этапа экстракции (ОК), свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае следует повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля (К+) ПЦР (**KSG2**) в качественном анализе по каналу JOE/Yellow/HEX (*HHV6*) или FAM/Green отсутствует или более порогового, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *HHV6*.
3. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля экстракции (ПК) **ПКО ДНК HHV6 и ДНК человека** по каналам JOE/Yellow/HEX (*HHV6*), FAM/Green отсутствует или более порогового, результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов, начиная с этапа ПЦР.
4. Если для данного образца не определено значение порогового цикла *Ct* или он выше порогового значения по каналу **JOE/Yellow/HEX**, а по каналу **FAM/Green** получено значение *Ct* превышающее максимальное значение, приводимое для ВКО, необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа экстракции. Возможная причина – ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или наличие ингибиторов ПЦР.
5. Для клинических образцов, в которых появились значения *Ct* по каналу JOE/Yellow/HEX (ДНК *HHV6*), превышающие максимальное пороговое значение, 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.
6. Если при проведении количественного теста значения копий на реакцию в калибраторах более чем на 30% отличаются от заданных, необходимо проверить порядок размещения пробирок в роторе (калибраторы должны находиться в ячейках, соответствующих названию *Standard* в таблице образцов, концентрация образцов должна соответствовать концентрации, указанной во вкладыше, а для приборов роторного типа лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо

исследуемой пробиркой (не пустой).

7. Если при проведении количественного теста коэффициент корреляции R в окне **Standard Curve** менее 0.9, это означает сбой калибровки. Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. Если это не помогает – переставить ПЦР для всех проб и калибраторов.

**РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК *HHV6***

**Расчет концентрации ДНК *HHV6* на мл образца при экстракции ДНК из смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости (ликвора)** проводится по формуле:

$$\text{КК ДНК } HHV6 = \text{КДНК } HHV6 \times 100 \text{ (копии/мл)}$$

**К ДНК *HHV6*** – количество копий ДНК *HHV6* в ДНК-пробе

**Расчет концентрации в логарифмах копий ДНК *HHV6* на  $10^5$  клеток при экстракции ДНК из материала, содержащего клетки цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов проводится по формуле:**

$$\lg\left\{\frac{\text{число\_копий\_ДНК\_HHV6\_в\_ПЦР-пробе}}{\text{число\_копий\_ДНК\_Glob\_в\_ПЦР-пробе}} \times 2 \cdot 10^5\right\} = \lg \{ \text{копий ДНК } HHV6 / 10^5 \text{ клеток} \}.$$

Для выражения относительной концентрации ДНК *HHV6* в копиях на стандартное количество клеток (например, на  $10^5$ ) используется коэффициент пересчета:

$$10^5 \text{ клеток} = 2 \cdot 10^5 \text{ геномов человека}$$

К каждому набору реагентов прилагается **Вкладыш**, в котором указаны концентрации ДНК-калибраторов, необходимые для расчета концентраций исследуемых проб и оценки достоверности полученных результатов.

**Пример расчета с помощью таблицы Excel логарифмов копий ДНК *HHV6* на  $10^5$  клеток** (см. табл. 1):

1. Скопировать столбец с названием проб (Name) из открывшегося окна «Text Report» и вставить в первый столбец таблицы Excel (Столбец A).
2. Скопировать значения концентраций ДНК *HHV6*, канал Yellow (HEX/JOE) (Calc Conc (copies/reaction)) и вставить во второй столбец таблицы Excel (столбец B)
3. Скопировать значения концентраций ДНК Glob канал Green (FAM) (Calc Conc (copies/reaction)) и вставить в третий столбец таблицы Excel (столбец C)
4. В четвертом столбце (столбец D) задать формулу (**E=LOG(B/C\*200000)**), как показано в приводимой ниже таблице. Появятся значения  $\lg HHV6 / 10^5$ .
5. В пятом столбце задать формулу (**F=B/C\*200000**) как показано в приводимой ниже таблице. В ячейках последнего столбца появятся копии *HHV6* /  $10^5$ .

Пример расчета с помощью таблицы Excel логарифмов копий ДНК HHV6 на 10<sup>5</sup> клеток при экстракции ДНК из суспензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов)

Name	Calc Conc (copies/ reaction) Yellow (HEX/JOE)	Calc Conc (copies/ reaction) Green (FAM)	Ig HHV6 / 10 <sup>5</sup>	копий HHV6 / 10 <sup>5</sup>
A	B	C	E=LOG(B/C*200000)	F=B/C*2000000
1	8742	125640	4,1	13916
2	253	87787	2,8	576
3		43564		
4	648	16354	3,9	7925
5		88736		
KSG1	9962	9793		
KSG1	10038	10211		
KSG2	94	102		
KSG2	107	98		
K-				