

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов для выявления и дифференциации возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами: РНК *TBEV* – вируса клещевого энцефалита (Tick-borne encephalitis virus), *B.burgdorferi sl* – возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), *E.chaffeensis* и *E.muris* – возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ДНК *A.phagocytophilum* возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) – в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL*»

АмплиСенс®



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



Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

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 ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	25
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P (Stratagene, США).....	32

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами: РНК *TBEV* – вируса клещевого энцефалита (Tick-borne encephalitis virus), *B.burgdorferi sl* – возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), *E.chaffeensis* и *E.muris* – возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ДНК *A.phagocytophilum* – возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) – в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL*» совместно с приборами для ПЦР в реальном времени:

- RotorGene 3000, RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия),
- MX3000P (Stratagene, США).

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
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR

¹ 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 ²			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для лизиса	 Опасно (Danger)	 Опасно (Danger)	Гуанидин тиоцианат	Нет данных			
			Трилон 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

² 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 (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 ²			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмывки 4	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость или головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Опасно (Danger)</p>	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость или головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Опасно (Danger)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Раствор для преципитации	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость или головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Опасно (Danger)</p>	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость или головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Опасно (Danger)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

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)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора **Rotor-Gene 3000**, **Rotor-Gene 6000** и **Rotor-Gene Q** рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (для детекции через дно пробирки) или пробирок на 0,1 мл.

Поместить пробирки в ячейки ротора прибора **Rotor-Gene 3000/6000/Rotor-Gene Q** начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе); установить ротор в прибор, закрыть крышку.

ВНИМАНИЕ! Первыми в прибор ставятся пробирки с **ПЦР-смесью-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.** в том случае, если тест будет проводиться одновременно с двумя видами ПЦР-смесей.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для англоязычной версии программы Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 / 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 не используются пробирки с выпуклыми крышками (Rotor-Gene 3000) или надето 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 **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 следующие параметры (см. табл. 1):

Таблица 1

Программа амплификации

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	10 с	–	5
	60	30 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	40
	56	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

6. Нажать кнопку **ОК/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн..**
8. Далее необходимо:
- осуществить калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - установить калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
9. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
10. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
11. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**.

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

Анализ результатов

Результаты анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green:

1. Активировать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green**, затем **Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равное **5 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации по каналу JOE/Yellow:

1. Активировать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow**, затем **Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**), равное **5 %**.

6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации по каналу ROX/Orange:

1. Активировать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**), равное 5 %.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

ВНИМАНИЕ! В том случае, если кривые флуоресценции не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**), равное 10 %.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 2). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в таблице 2 для приборов **Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000** и **Rotor-Gene Q**.

Результаты анализа контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange
Для ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.				
		<u>Детекция TBEV</u>	<u>Детекция A.phagocytophilum</u>	<u>Детекция E.chaffeensis / E.muris</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
В-	Экстракция НК	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI	ПЦР	<27	<27	<27
Для ПЦР-смеси-1-FRT B.b. sl / ВКО				
		<u>Детекция ВКО</u>	<u>Детекция B.burgdorferi sl</u>	–
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	–
В-	Экстракция НК	<30	<u>отсутствует</u>	–
ПКО TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI	ПЦР	<27	<27	–

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- κДНК *TBEV* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 3.
- ДНК *A.phagocytophilum* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 3.
- κДНК *E.chaffeensis/E.muris* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу ROX/Orange определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 3.
- κДНК *B.burgdorferi sl* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО* для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 3.

При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- кДНК/ДНК вышеописанных микроорганизмов **не обнаружены**, если для данной пробы при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. таблицу 3); а по каналу, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, не определено значение порогового цикла.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для регистрации специфического сигнала, и по каналу FAM/Green (при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО**) значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Таблица 3

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange
<i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>	Детекция <i>TBEV</i>	Детекция <i>A.phagocytophilum</i>	Детекция <i>E.chaffeensis / E.muris</i>
	<38	<38	<38
<i>B.b. sl / ВКО</i>	Детекция ВКО	Детекция <i>B.burgdorferi sl</i>	–
	<35	<38	–

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

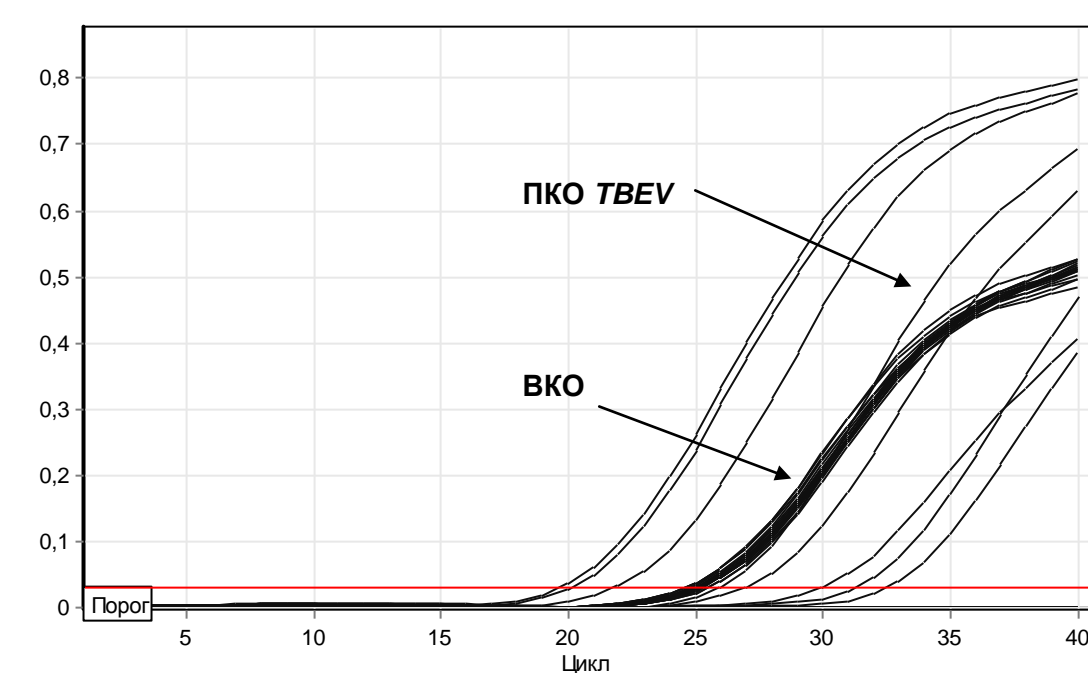
1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен снова, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по какому-либо каналу (или каналам) FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** и по каналам FAM/Green и JOE/Yellow при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*** отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить

амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).

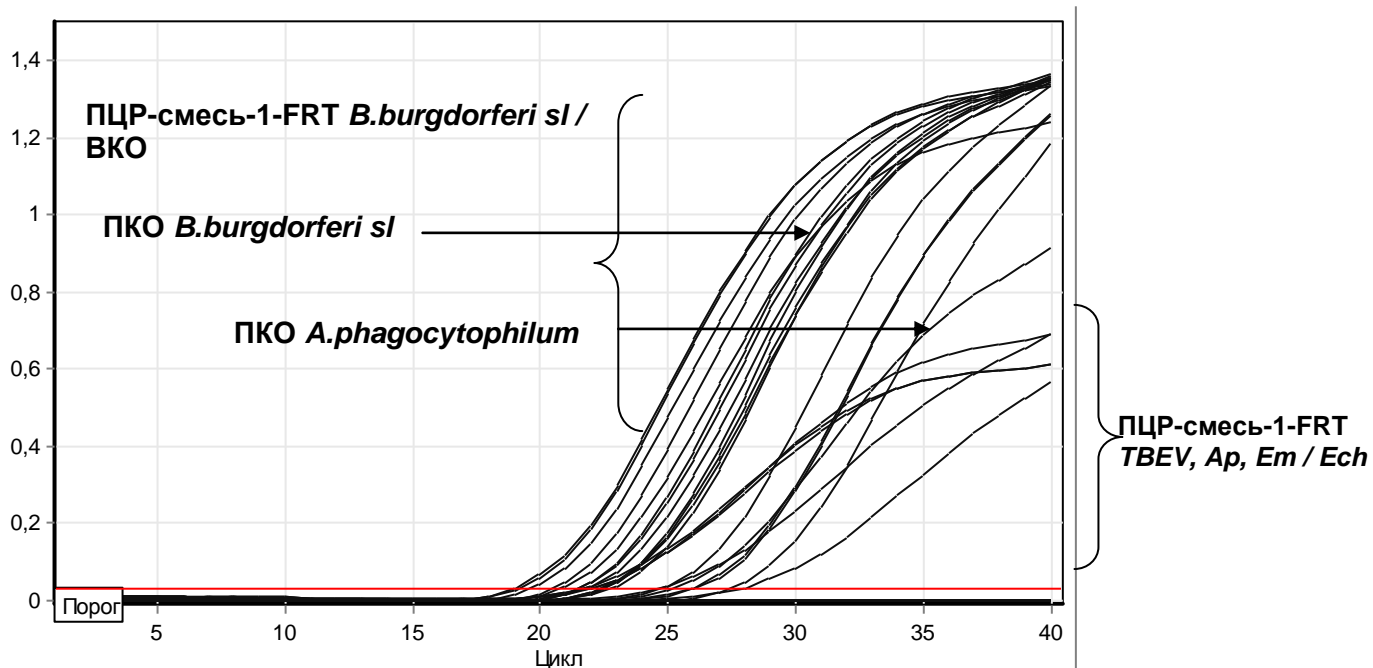
3. Если для отрицательного контроля экстракции НК (В-) (по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV*, *A.ph.*, *E.ch.* / *E.m.* и по каналу JOE/Yellow при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК или кДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).

Пример анализа результатов на приборе Rotor-Gene 6000

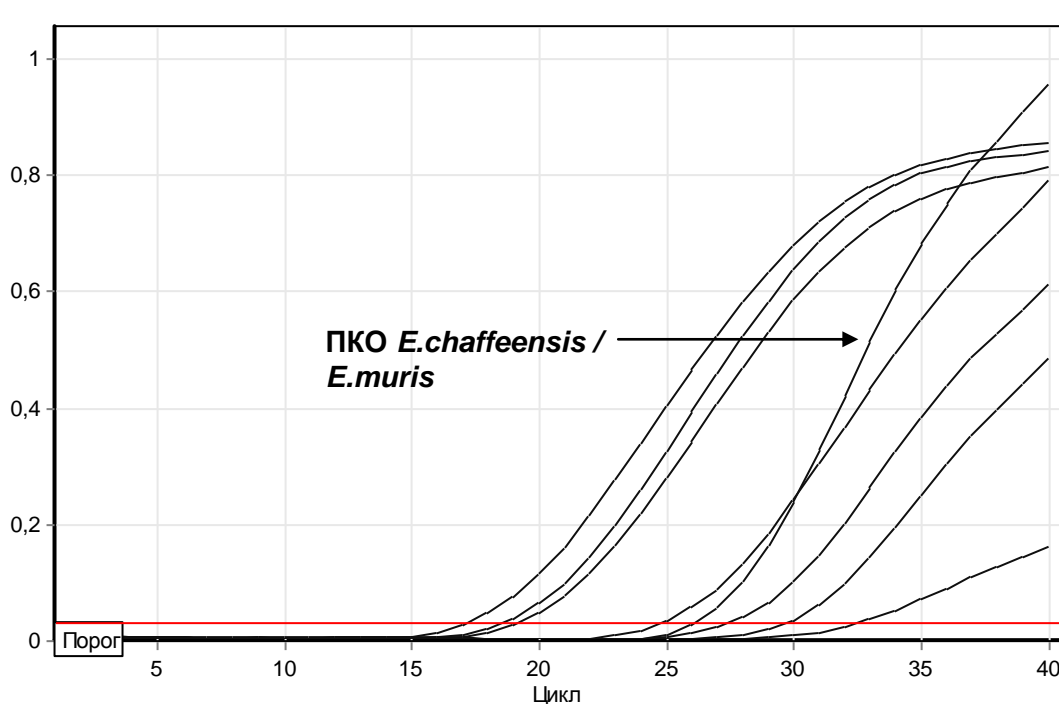
Канал FAM/Green (для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV*, *A.ph.*, *E.ch.* / *E.m.* амплификация кДНК *TBEV*, для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО амплификация кДНК ВКО)



Канал JOE/Yellow (для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV*, *A.ph.*, *E.ch.* / *E.m.* амплификация ДНК *A.phagocytophilum*, для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО амплификация кДНК *B.burgdorferi sl*)



Канал ROX/Orange (для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV*, *A.ph.*, *E.ch.* / *E.m.* амплификация кДНК *E.chaffeensis* / *E.muris*)



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

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Открыть программу *iCycler/iQ5*.
3. Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам FAM, JOE/HEX и ROX при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и по каналам FAM, JOE/HEX при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*.
 - Для прибора *iCycler iQ5* для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля *Workshop* нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета возможно в режиме **Whole Plate loading**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
 - Для прибора *iCycler iQ* отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля *Workshop*. Для этого в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам FAM, JOE/HEX и ROX для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и во всех пробирках по каналам FAM, JOE/HEX для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*.
 - Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением **.pts**) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением **.pts**) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.
4. Задать программу амплификации (табл. 4).

Программа амплификации для приборов iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США)

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	5
	60	35 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	10 с	–	40
	56	35 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	72	15 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (файл с расширением **.tmo**) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

5. Поместить предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой:

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/плашку при установке в прибор.

- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Use Persistent Well Factors**.

Аmplификацию необходимо проводить с использованием такого же типа пластика, в котором проводилась калибровка прибора. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**. Выбрать тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**.

- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Persistent Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – **25** мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Результаты анализируются на основании наличия (или отсутствия) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна иметь выраженную S-образную форму на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции и однократно пересекать пороговую линию.

Обработка данных.

- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Lybrary** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyse Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок соответствующего канала. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. При обработке результатов, полученных при использовании ПЦР-смеси-1-FRT **TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.**, необходимо в меню **Display wells** отключить ячейки, в которых анализировались пробы с ПЦР-смесью-1-FRT **B.b. sl / BKO**. При обработке результатов, полученных при использовании ПЦР-смеси-1-FRT **B.b. sl / BKO**, необходимо в меню **Display wells**

отключить ячейки, в которых анализировались пробы с ПЦП-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения *Ct*.

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по соответствующему каналу. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию).

Анализ результатов амплификации при использовании ПЦП-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*

Анализ результатов амплификации кДНК *TBEV*:

1. Нажать в меню анализа данных (**Data Analysis**) кнопку **FAM**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. Установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 25**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 200**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации ДНК *A.phagocytophilum*:

1. Нажать в меню анализа данных (**Data Analysis**) кнопку **JOE**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. Установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 25**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 100**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации кДНК *E.muris, E.chaffeensis*:

1. Нажать в меню анализа данных (**Data Analysis**) кнопку **ROX**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. Установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 25**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold**

Position = 100. Нажать **OK**.

4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО

Анализ результатов амплификации ВКО:

1. Нажать в меню анализа данных (**Data Analysis**) кнопку **FAM**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. В открывшемся окне установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 25**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 50**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации ДНК *B.burgdorferi sl*:

1. Нажать в меню анализа данных (**Data Analysis**) кнопку **JOE**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. Установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 25**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 100**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК. Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в таблице 5 для приборов iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США).

Результаты анализа контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
		FAM	JOE/HEX	ROX
Для ПЦР-смеси-1-FRT <i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>				
		<u>Детекция <i>TBEV</i></u>	<u>Детекция <i>A.phagocytophilum</i></u>	<u>Детекция <i>E.chaffeensis / E.muris</i></u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
В-	Экстракция НК	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m./STI</i>	ПЦР	<30	<31	<30
Для ПЦР-смеси-1-FRT <i>B.b. sl / ВКО</i>				
		<u>Детекция ВКО</u>	<u>Детекция <i>B.burgdorferi sl</i></u>	–
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	–
В-	Экстракция НК	<33	<u>отсутствует</u>	–
ПКО <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI</i>	ПЦР	<30	<30	–

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- кДНК *TBEV* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 6.
- ДНК *A.phagocytophilum* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 6.
- кДНК *E.chaffeensis/E.muris* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу ROX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 6.
- кДНК *B.burgdorferi sl* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО* для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 6.

При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- кДНК/ДНК вышеописанных микроорганизмов **не обнаружены**, если для данной пробы при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** в таблице результатов по каналу FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. таблицу 6); а по каналу, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, не определено значение порогового цикла.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для регистрации специфического сигнала, и по каналу FAM (при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО**) значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

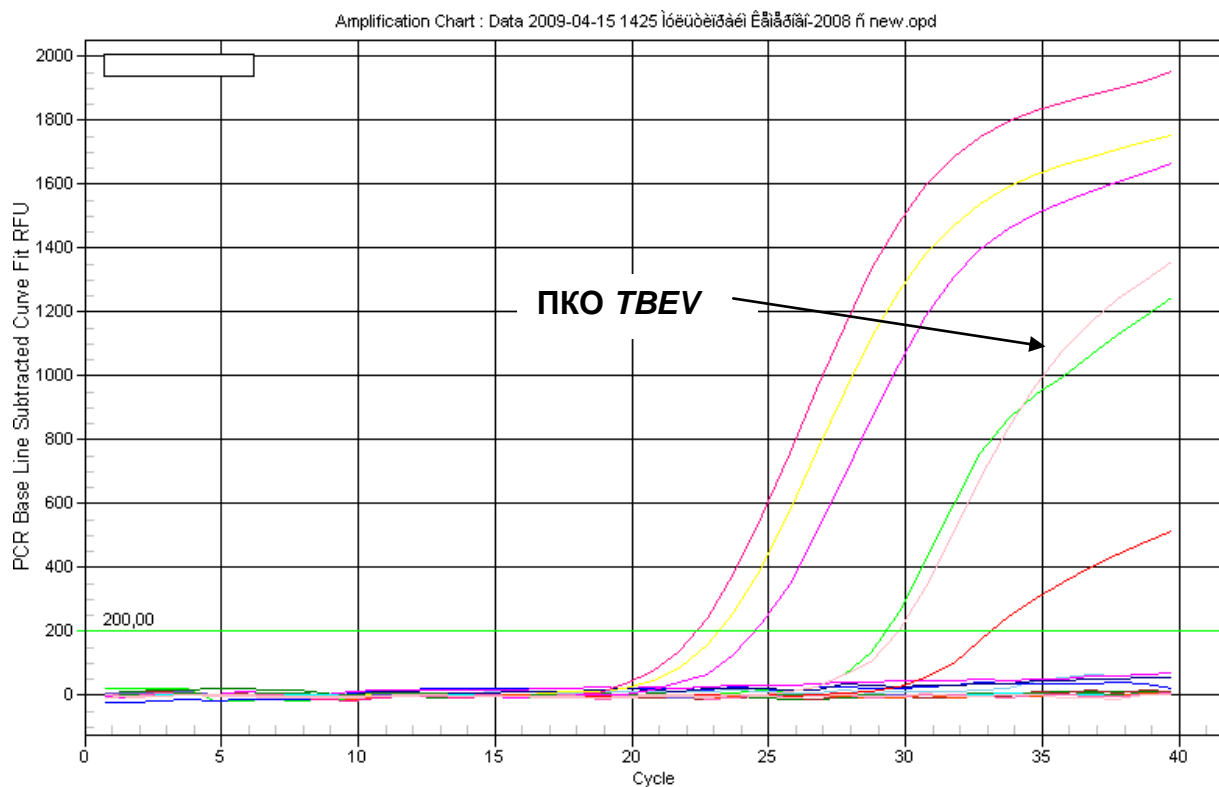
Таблица 6

Результаты анализа исследуемых образцов

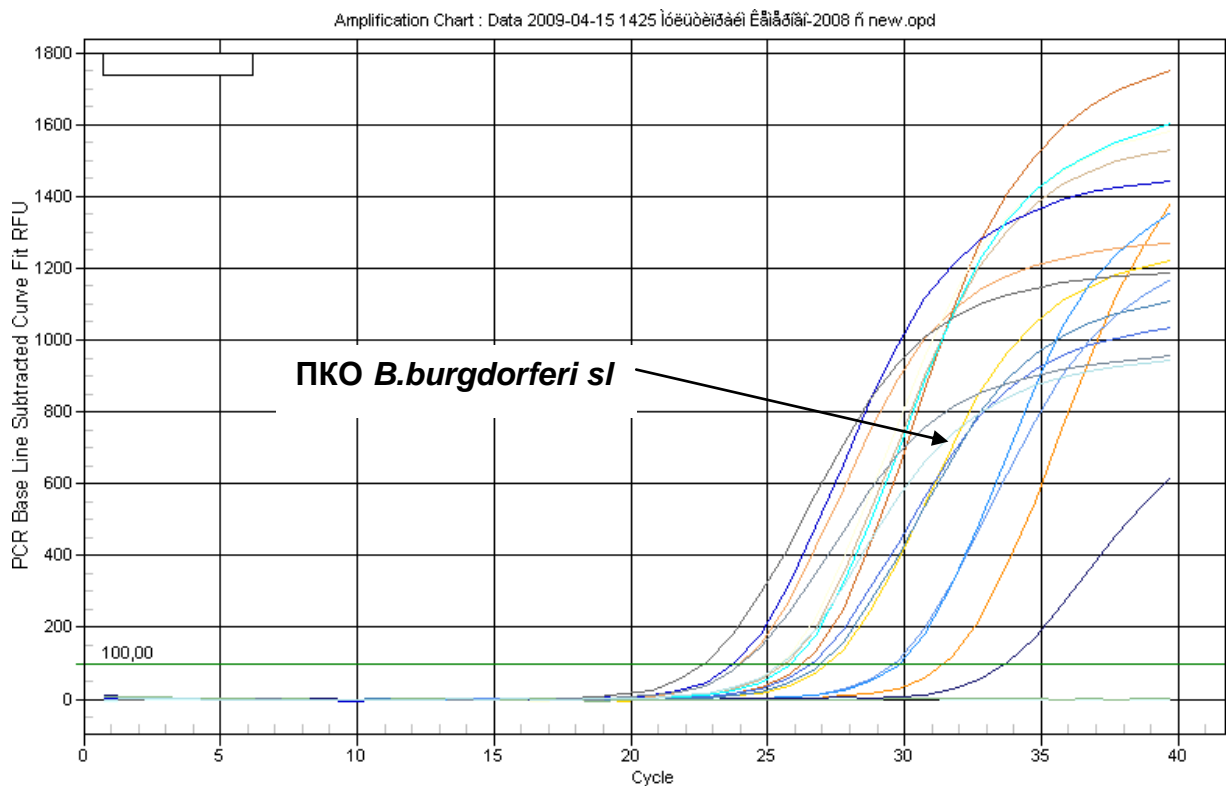
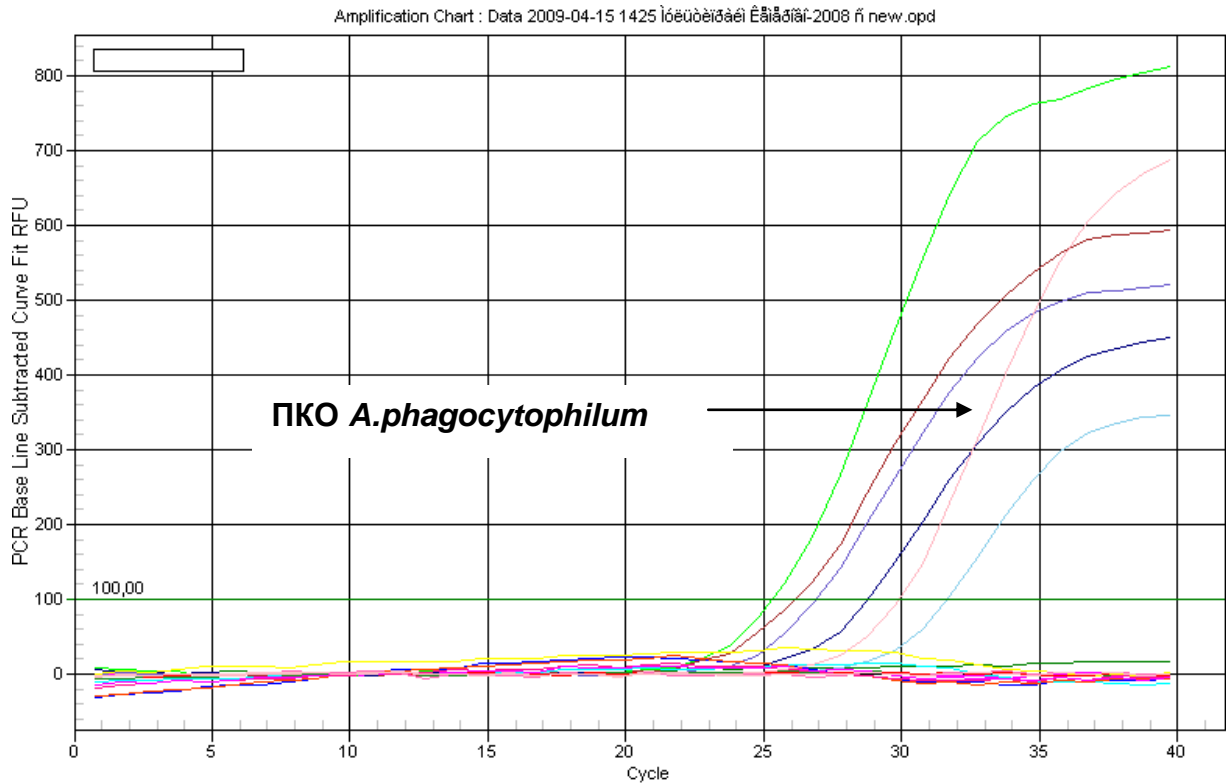
ПЦР-смесь-1-FRT/FRT	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM	JOE/HEX	ROX
<i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>	Детекция <i>TBEV</i>	Детекция <i>A.phagocytophilum</i>	Детекция <i>E.chaffeensis / E.muris</i>
	<39	<39	<39
<i>B.b. sl</i> / ВКО	Детекция ВКО	Детекция <i>B.burgdorferi sl</i>	–
	<38	<39	–

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

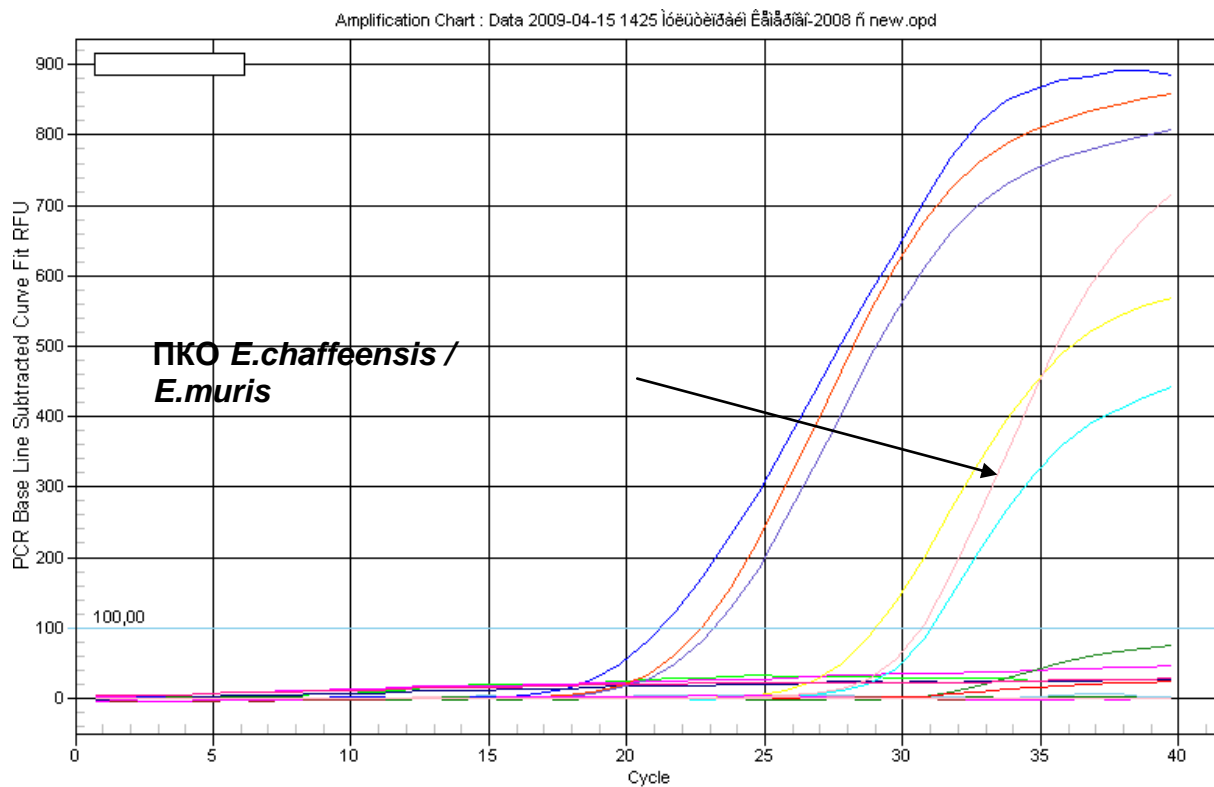
- Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен снова, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по какому-либо каналу (или каналам) FAM, JOE/HEX, ROX при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** и по каналам FAM и JOE/HEX при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).



Канал JOE/HEX (для ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m. амплификация ДНК A.phagocytophilum, для ПЦР-смеси-1-FRT B.b. sl / ВКО амплификация кДНК B.burgdorferi sl)



Канал ROX (для ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m. амплификация кДНК E.chaffeensis / E.muris)



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. Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

1. Включить прибор и запустить программу *ДТ-96 v.7.3*.
2. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим *Работа с прибором*.
3. В диалоговом окне *Список приборов* выбрать необходимый прибор и нажать кнопку *Подключить*.
4. В меню *Тест* выбрать команду *Создать новый тест*, ввести название нового теста и нажать кнопку *ОК*. Для данной диагностической системы рекомендуется создать два теста: для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*. В появившемся окне *Тест* для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* задать следующие параметры:

- *Тип* – качественный
- *Метод* – Пороговый (Ct)
- *Пробирки* – отметить галочкой образец
- *Контроли* – нет
- *Объем рабочей смеси в пробирке* – 25 мкл
- *Флуорофоры* – Fam – специфика; Hex – специфика; Rox – специфика.

В появившемся окне «Тест» для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО* задать следующие параметры:

- *Тип* – качественный
- *Метод* – Пороговый (Ct)
- *Пробирки* – отметить галочкой образец
- *Контроли* – нет
- *Объем рабочей смеси в пробирке* – 25 мкл
- *Флуорофоры* – Fam – ВКО; Hex – специфика.

5. Задать программу амплификации с применением команды *Создать новую программу/редактировать программу* (см. табл.7):

**Программа амплификации для формы комплектации 1 – «ПЦР-комплект»
вариант FRT**

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	–	1
2	95	10 с	–	5
	60	35 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	10 с	–	40
	56	35 с	Fam, Hex, Rox	
	72	15 с	–	

6. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать соответствующее название теста, указать количество образцов и нажать **ОК** для **ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.** Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне **Свободное заполнение**. Нажать кнопку **Применить**. Аналогично заполнить протокол для **ПЦР-смеси-1-FRT B.b. sI / ВКО**.

7. Указать **Объем рабочей смеси - 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.

8. 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 стрипы/плашку при установке в прибор.

9. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов

Обработка данных.

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**. В открывшейся вкладке установить **Критерий положительного результата ПЦР – 60 %**, **Величина Threshold – 10**, **Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 5 %**. Опцию **Нормализация**

данных не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку **Применить**.

5. Отключить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Ф** (отжать кнопку).
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии.

Поочередно для каналов Fam, Нех и Rox установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на значении, при котором кривые флуоресценции носят сигмовидный характер. Рекомендуемые пороговые линии: для канала Fam – 100, для канала Нех – 50, для канала Rox – 50. В том случае, если кривые флуоресценции пересекают пороговую линию, не имея характерную сигмовидную форму, уровень пороговой линии необходимо повысить. Нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат ***MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML**, выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 5). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в таблице 8 для прибора «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Результаты анализа контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
		Fam	Hex	Rox
Для ПЦР-смеси-1-FRT <i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>				
		<u>Детекция <i>TBEV</i></u>	<u>Детекция <i>A.phagocytophilum</i></u>	<u>Детекция <i>E.chaffeensis/ E.muris</i></u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
В-	Экстракция НК	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI</i>	ПЦР	<30	<33	<30
Для ПЦР-смеси-1-FRT <i>B.b. sl / ВКО</i>				
		<u>Детекция ВКО</u>	<u>Детекция <i>B.burgdorferi sl</i></u>	
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	–
В-	Экстракция НК	<34	<u>отсутствует</u>	–
ПКО <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI</i>	ПЦР	<30	<33	–

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- кДНК *TBEV* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу Fam определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 9.
- ДНК *A.phagocytophilum* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу Hex определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 9.
- кДНК *E.chaffeensis/E.muris* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* для данной пробы в таблице результатов по каналу Rox определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 9.
- кДНК *B.burgdorferi sl* обнаружена, если при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО* для данной пробы в таблице результатов по каналу Hex определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 9.

При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- кДНК/ДНК вышеописанных микроорганизмов **не обнаружены**, если для данной пробы при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** в таблице результатов по каналу Fam определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. таблицу 9); а по каналу, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, не определено значение порогового цикла.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для регистрации специфического сигнала и по каналу Fam (при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО**) значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Таблица 9

Результаты анализа исследуемых образцов

ПЦР-смесь-1-FRT/FRT	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	Fam	Hex	Rox
<i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>	Детекция <i>TBEV</i>	Детекция <i>A.phagocytophilum</i>	Детекция <i>E.chaffeensis / E.muris</i>
	<39	<39	<39
<i>B.b. sl</i> / ВКО	Детекция ВКО	Детекция <i>B.burgdorferi sl</i>	–
	<38	<39	–

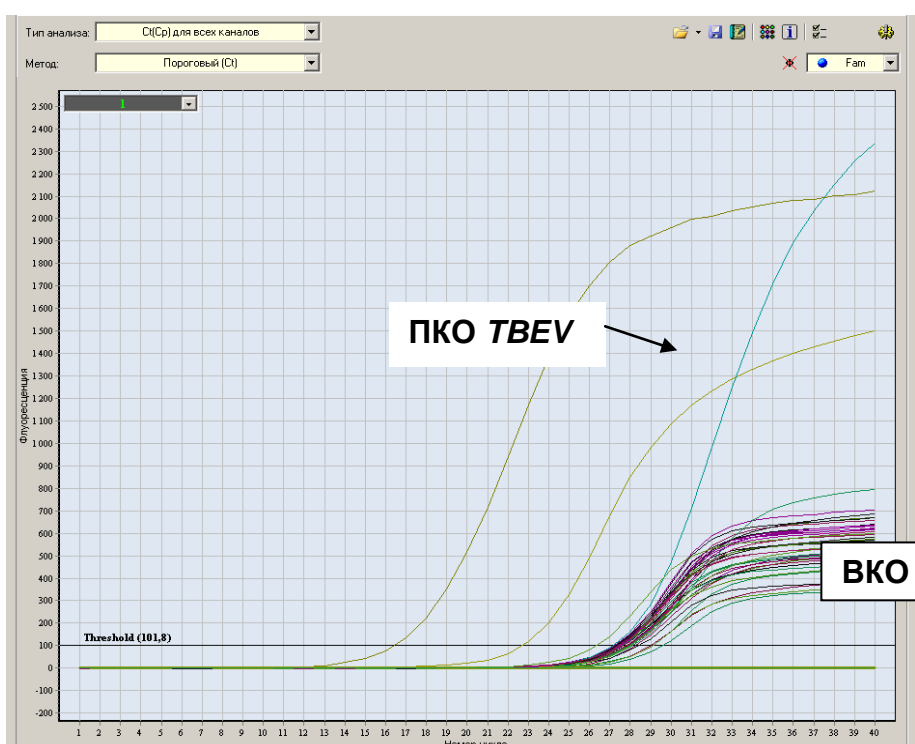
Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

- Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен снова, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по какому-либо каналу (или каналам) Fam, Hex, Rox при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** и по каналам Fam и Hex при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).

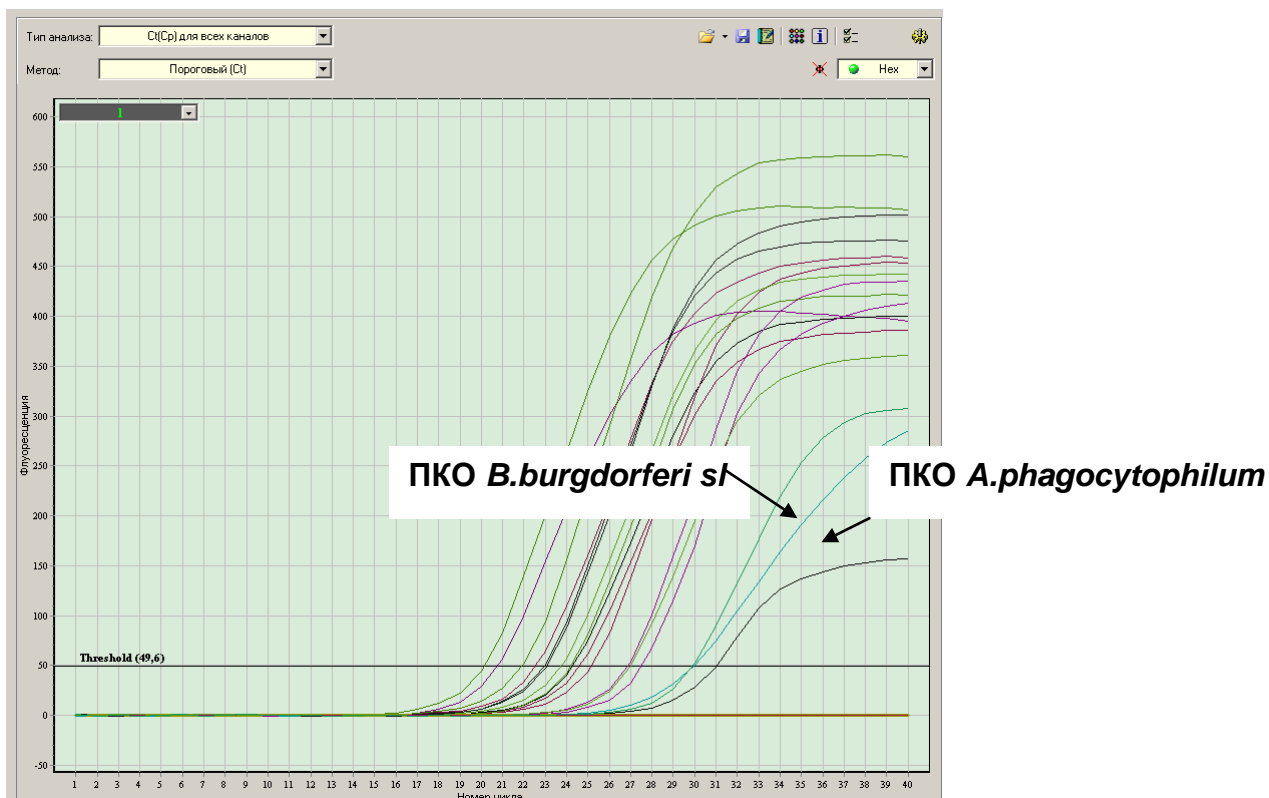
- Если для отрицательного контроля экстракции РНК (В-) (по каналам Fam, Hex, Rox при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и по каналу Hex при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу.

Пример анализа результатов на приборе «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия)

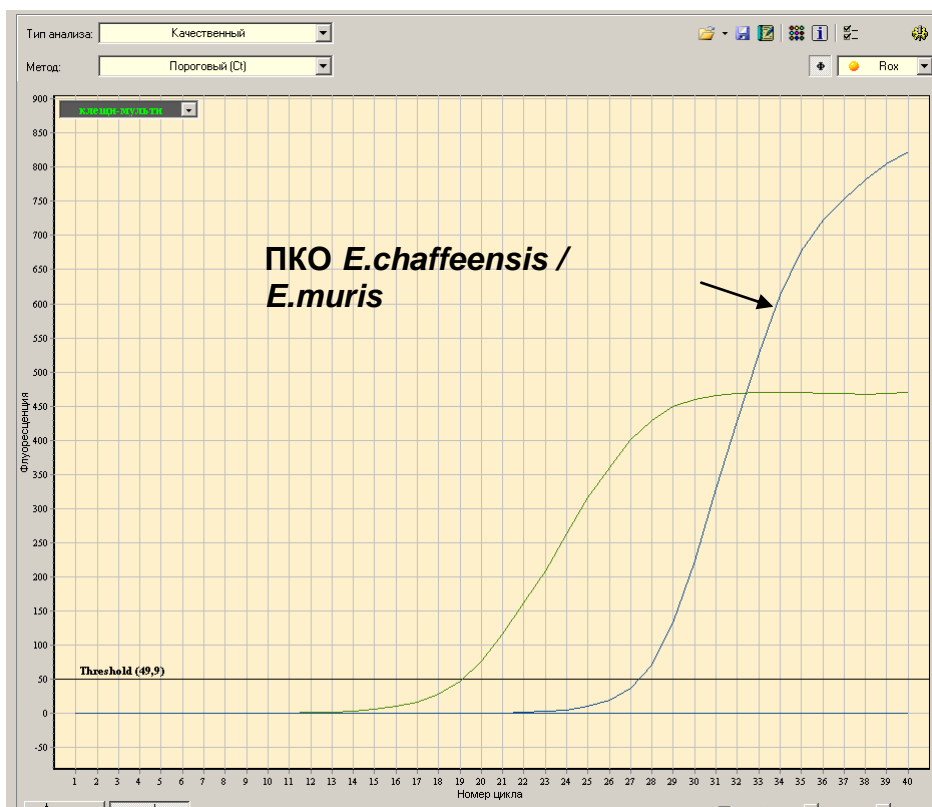
Канал Fam (для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* амплификация кДНК *TBEV*, для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО* амплификация кДНК *ВКО*)



Канал Hex (для ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, *A.ph.*, *E.ch.* / *E.m.* амплификация ДНК *A.phagocytophilum*, для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО амплификация кДНК *B.burgdorferi sl*)



Канал Rox (для ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, *A.ph.*, *E.ch.* / *E.m.* амплификация кДНК *E.chaffeensis* / *E.muris*)



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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

1. Включить прибор и запустить программу **Stratagene Mx3000P**.
2. В окне **New Experiment Options** выберите пункт **Quantitative PCR (Multiple Standarts)** и установите флажок **Turn lamp on for warm-up**.

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

3. Установить пробирки в прибор, закрыть фиксатор и дверцу прибора.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **FAM filter set** установить параметр **FAM**, напротив **HEX/JOE filter set** – **JOE**, напротив **ROX filter set** – **ROX**.
5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки с **ПЦР-смесью-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch./E.m.**, и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры **FAM, JOE/HEX, ROX**. Далее выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки с **ПЦР-смесью-1-FRT B.b. s/ВКО**, и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры **FAM, JOE/HEX**.
6. В окне **Well Information** внести имя для каждого исследуемого образца.
7. На вкладке **Plate Setup** задать параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки, и в выпадающем меню **Well type** выбрать **Unknown** и поле **Collect fluorescence data**. Отметить флуорофоры **FAM, JOE/HEX, ROX**.
8. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации (см. табл. 10).

**Программа амплификации для формы комплектации 1 – «ПЦР-комплект»
вариант FRT для прибора Mx3000P (Stratagene, США)**

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	5
	60	35 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	10 с	–	40
	56	35 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	72	15 с	–	

9. В меню выбрать команду **Run**. Проверить правильность заданной программы амплификации. Нажать кнопку **Start**. Поставить галочку в окошке **Turn lamp off at end of run**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов

Обработка данных.

1. Открыть сохраненный файл данных и перейти в режим **Analysis**.
2. Активировать в меню окно **Results**.
3. В блоке **Area to analyze** выбрать строку **Amplification plots**.
4. В блоке **Threshold fluorescence** для каждого из каналов установить уровень пороговой линии на значении, при котором кривые флуоресценции носят линейный характер: для всех каналов рекомендуется выбрать уровень пороговой линии равный 500. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмовидные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
5. В блоке **Area to analyze** выбрать строку **Text report**.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 11). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в таблице 11 для прибора **Mx3000P (Stratagene, США)**.

Результаты анализа контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
		FAM	JOE/HEX	ROX
Для ПЦР-смеси-1-FRT <i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>				
		<u>Детекция <i>TBEV</i></u>	<u>Детекция <i>A.phagocytophilum</i></u>	<u>Детекция <i>E.chaffeensis / E.muris</i></u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ОК	Экстракция НК	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ПКО <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI</i>	ПЦР	<30	<31	<30
Для ПЦР-смеси-1-FRT <i>B.b. sl / ВКО</i>				
		<u>Детекция <i>ВКО</i></u>	<u>Детекция <i>B.burgdorferi sl</i></u>	
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	–
ОК	Экстракция НК	<34	<u>отсутствует</u>	–
ПКО <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI</i>	ПЦР	<30	<30	–

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- **кДНК *TBEV* обнаружена**, если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 12.
- **ДНК *A.phagocytophilum* обнаружена**, если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 12.
- **кДНК *E.chaffeensis/E.muris* обнаружена**, если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** для данной пробы в таблице результатов по каналу ROX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 12.
- **кДНК *B.burgdorferi sl* обнаружена**, если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*** для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное в таблице 12.

При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- кДНК/ДНК вышеописанных микроорганизмов **не обнаружены**, если для данной пробы при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** в таблице результатов по каналу FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. таблицу 12). А по каналу, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, не определено значение порогового цикла.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для регистрации специфического сигнала, и по каналу FAM (при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО**) значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Таблица 12

**Результаты анализа исследуемых образцов
для прибора Mx3000P (Stratagene, США)**

ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Сигнал по каналу (пороговые циклы)		
	FAM	JOE/HEX	ROX
<i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>	Детекция <i>TBEV</i>	Детекция <i>A.phagocytophilum</i>	Детекция <i>E.chaffeensis / E.muris</i>
	<39	<39	<39
<i>B.b. sl</i> / ВКО	Детекция ВКО	Детекция <i>B.burgdorferi sl</i>	–
	<38	<39	–

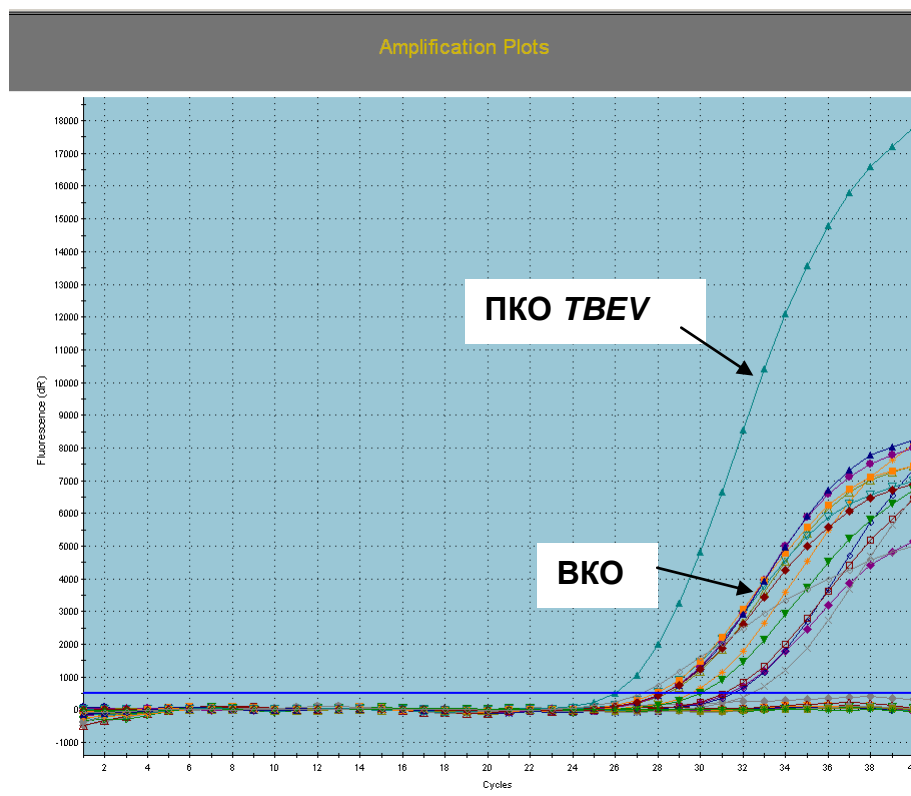
Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

- Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен снова, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по какому-либо каналу (или каналам) FAM, JOE/HEX, ROX при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** и по каналам FAM и JOE/HEX при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).

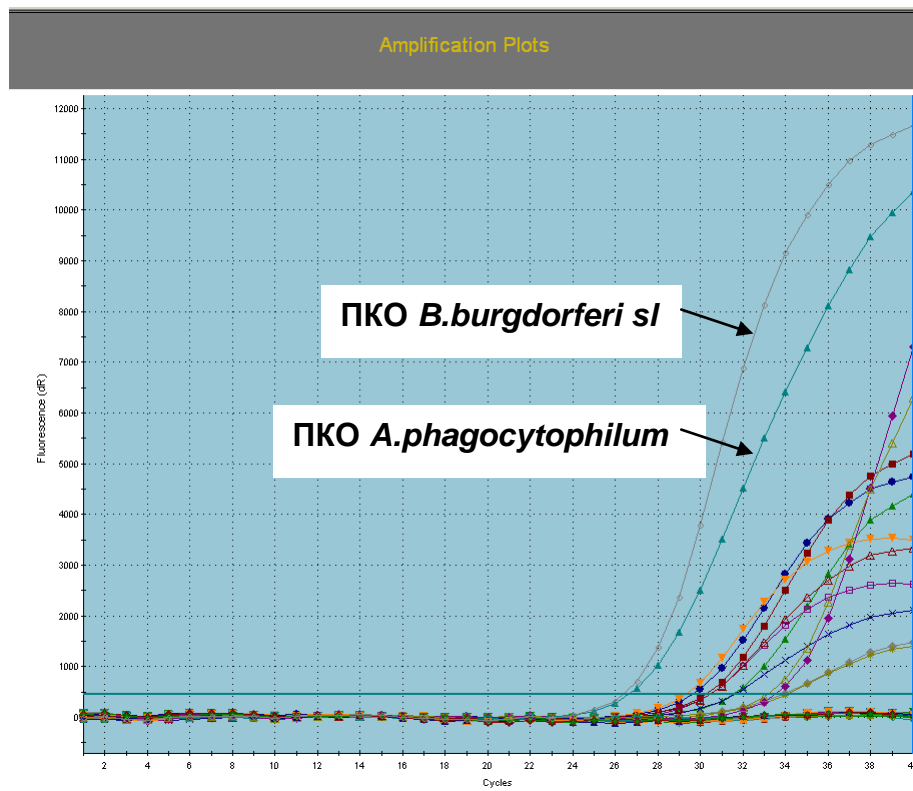
- Если для отрицательного контроля экстракции РНК (В-) (по каналам FAM, JOE/HEX, ROX при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и по каналу JOE/HEX при использовании ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу.

Пример анализа результатов на приборе Mx3000P (Stratagene, США)

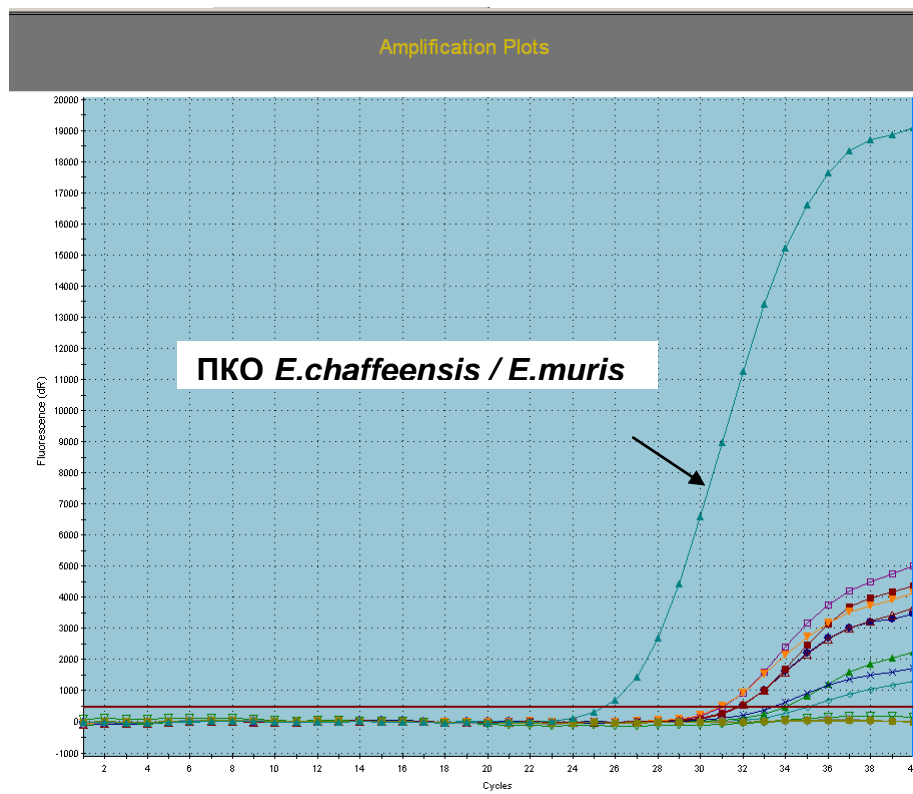
Канал FAM (для ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* амплификация кДНК TBEV, для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО* амплификация кДНК ВКО)



Канал JOE/HEX (для ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, *A.ph.*, *E.ch.* / *E.m.* амплификация ДНК *A.phagocytophilum*, для ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО амплификация кДНК *B.burgdorferi sl*)



Канал ROX (для ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, *A.phagocytophilum*, *E.chaffeensis* / *E.muris* амплификация кДНК *E.chaffeensis* / *E.muris*)



Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
03.06.10	ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия)	Изменена продолжительность первой стадии амплификации с 5 мин на 15 мин в соответствии с программой амплификации, описанной в инструкции
13.07.10	Назначение	Удалена Таблица 1 «Соответствие наименований ПЦР-смесей-1-FRT и каналов детекции возбудителей инфекций, передаваемых иксодовыми клещами».
	По тексту	Изменена нумерация таблиц.
	Порядок проведения реакции амплификации, Анализ и учет результатов при помощи приборов «Rotor-Gene» 3000, «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия) и «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия). Анализ результатов	Значение порога отрицательных проб изменено с 10% на 5%.
		« ВНИМАНИЕ! При анализе кривых флуоресценции по всем каналам рекомендуется после выбора параметра « More settings »/« Outlier Removal »/« Устранение выбросов » сначала установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона - ПФ) равное 5% и в случае характерного экспоненциального роста кривых флуоресценции учитывать результаты реакции. В том случае, если кривые флуоресценции не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона - ПФ) равное 10%.» заменено на « ВНИМАНИЕ! В том случае, если кривые флуоресценции не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона - ПФ) равное 10%.»
Порядок проведения реакции амплификации, Анализ и учет результатов при помощи прибора «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия). Таблица 8	Продолжительность 1 этапа изменена с 5 на 15 минут.	
Порядок проведения реакции амплификации, Анализ и учет результатов при помощи прибора «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия). Анализ результатов	Критерий положительного результата ПЦР изменен с 90% с 60%	
16.09.10	По всему тексту	Проставлены пробелы до и после «/» в названии набора, ПЦР-смесей-1 и ПКО, а также при перечислении возбудителей.

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
		Из названий иностранных приборов и фирм-производителей удалены кавычки.
24.10.11 VV	По тексту	Исправления по шаблону Добавлен раздел «Меры предосторожности», включающий таблицу реагентов, подлежащих маркировке как содержащие опасные вещества
03.04.12 IV	Нижний колонтитул	Дата изменения и каталожный номер заменены на соответствующие символы
07.06.12 VO	Титульная страница	Убран нижний колонтитул Добавлен знак IVD, знак и адрес производителя
	Нижний колонтитул	Добавлено Формат FRT
15.08.12 IV	Титульная страница	Добавлены подпись и печать директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии В.И. Покровского
24.05.13 ME	Назначение	Добавлена таблица «Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции»
	По тексту	Названия каналов детекции для каждой модели приборов приведены в соответствие с протоколом № 20 от 26.02.13
		Название производителя прибора исправлено с Qiagen на QIAGEN
Меры предосторожности	Изменено написание ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности» на ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности»	
28.08.14 PM	Титульная страница	Удалены подпись и печать директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии В.И. Покровского
		Символ IVD заменен на RUO
28.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
04.02.15 BS	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
13.04.15 ChA	Меры предосторожности	Откорректирована таблица с опасными реагентами
18.11.15 ME	Меры предосторожности	Раздел актуализирован в соответствии с шаблоном
16.07.18 PM	Меры предосторожности	Таблица с опасными реагентами переработана в соответствии с требованиями Регламента (ЕС) 1272/2008 и ГОСТ 31340-2013
	По тексту	«Производитель» заменен на «Изготовитель». «Учет результатов» замен на «Интерпретация результатов»
14.01.20 EM	Нижний колонтитул	Добавлен новый каталожный номер REF H-3932-1-0