

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Varicella-Zoster virus (VZV)*

в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® VZV-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
ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG, (bioMérieux, Франция).	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).....	7

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Varicella-Zoster virus (VZV)* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® VZV-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени» Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

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

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

ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG, (bioMérieux, Франция)

Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора.

Данный метод экстракции позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции ДНК – (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Lysed**, очередность экстракции ДНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing-No, On-board Lysis Incubation-No**.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-87**. Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

ВНИМАНИЕ! При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объёмом 1,5 мл. После окончания инкубации (**пункт 8**) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG).

6. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 минут при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с

аэрозольным фильтром по **10 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.

10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов вне прибора (**Off board**).
11. После окончания экстракции ДНК извлечь пробирки из прибора.
12. Пробирки с ДНК-пробами переносят в зону амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации (ЗОНА 2).

Вариант 2. Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции ДНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **0,1-1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность экстракции ДНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит автоматически в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing-Yes, On-board Lysis Incubation-Yes**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В каждую пробирку, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл** подготовленных проб отдельным наконечником с аэрозольным фильтром.
6. **Для отрицательного контроля (ОК)** в пробирку, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл ОКО**.
7. В отдельной стерильной пробирке на 2 мл смешать **магнитную силику NucliSens** и **ВКО STI-87** стерильными наконечниками с фильтром в следующем соотношении:

Количество образцов для экстракции ДНК	Количество магнитной силики NucliSens, мкл	Количество ВКО STI-87, мкл
1	10	10
24 (полная загрузка прибора)	250 (с запасом на 1 пробу)	250

8. Содержимое пробирки тщательно перемешать. Смесь магнитной силики NucliSens с ВКО STI-87 может храниться не более 30 мин.
9. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить

программу экстракции ДНК с лизисом образцов в приборе (**On board**).

10. Дождаться, пока прибор NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State – Idle** (примерно 15 мин).
11. Тщательно перемешать пробирку с приготовленной смесью магнитной силики NucliSens, ВКО STI-87 на вортексе до однородного состояния. Открыть крышку прибора и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **20 мкл приготовленной смеси**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью многоканального дозатора отдельными наконечниками с аэрозольным фильтром на 200 мкл.
12. Запустить на приборе программу продолжения экстракции ДНК.
13. После окончания экстракции ДНК извлечь пробирки из прибора. Пробирки с ДНК-пробами переносят в зону амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации (ЗОНА 2).

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором Rotor-Gene 6000 – 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/Q/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

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

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

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**, 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 следующие параметры (см. табл. 1).

Программа «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа²

Цикл	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	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **ОК/Да**.

6. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн..**

- осуществлять калибровку по каналам для флуорофоров **FAM/Green, JOE/Yellow** (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);

- для установки калибровки всех каналов нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал 5, Max Reading/Максим. Сигнал 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

7. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

8. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

9. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как **K–**, положительный – **K+**. Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

² Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или аналогичные.

Анализ результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора **FAM/Green** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК ВКО (ВКО STI-87)**,
- по каналу для флуорофора **JOE/Yellow** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК VZV**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

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

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.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 (NTC)**) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
7. В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
8. В отрицательном контроле ПЦР (К–) – **ТЕ-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
9. В положительном контроле ПЦР (К+) – **ПКО ДНК VZV-FL** – значение *Ct* не должно превышать указанное граничное значение.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM/Green):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.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 (NTC)**) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) должны появиться значения *Ct* для **ВКО STI-87** в каждом исследуемом образце и отрицательном контроле экстракции (ОК). При этом значение *Ct* не должно превышать указанное граничное значение.
7. В отрицательном контроле ПЦР (К–) – **ТЕ-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
8. В положительном контроле ПЦР (К+) – **ПКО ДНК VZV-FL** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу для флуорофора **JOE/Yellow** и/или для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров **FAM/Green** и **JOE/Yellow** зафиксировано значение порогового цикла *Ct*, это свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора **JOE/Yellow** отсутствует или превышает указанное граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК VZV.
3. Если значения *Ct* по каналу для флуорофора **FAM/Green** (внутренний контроль) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют – это означает сбой

этапа экстракции. Необходимо повторить анализ для этих образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

4. Если для анализируемого образца значение C_t по каналу для флуорофора **FAM/Green** (внутренний контроль) превышает указанное граничное значение, а значение C_t по каналу для флуорофора **JOE/Yellow** (ДНК VZV) больше 35, то необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа экстракции. Высокие значения C_t могут быть вызваны потерями ДНК при экстракции или наличием ингибиторов.