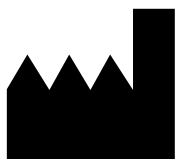


# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов  
для выявления и дифференциации РНК вируса денге  
(*Dengue virus*, DV) 1-4 типов в биологическом материале  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией  
**«АмплиСенс<sup>®</sup> *Dengue virus* type-FL»**  
Формат FRT

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |    |
|--|----|
| НАЗНАЧЕНИЕ .....   | 3  |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ<br>ПРИБОРОВ Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN,<br>Германия) ..... | 4  |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ<br>ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США) .....  | 9  |
| ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ .....   | 12 |

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации РНК вируса денге 1-4 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *Dengue virus type-FL*» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

### Соответствие мишеней и каналов детекции

| Детекция по каналу для флуорофора |     |     |     |       |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-------|
| FAM                               | JOE | ROX | Cy5 | Cy5.5 |
| DV1                               | DV2 | DV3 | DV4 | ВКО   |

### 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  |
| канал для флуорофора ROX   | ROX/Orange/TxR  |
| канал для флуорофора Cy5   | Cy5/Red   |
| канал для флуорофора Cy5.5 | Cy5.5/Crimson/Quasar705   |

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

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q следует использовать 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 англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 (Rotor-Gene Q) / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 (Rotor-Gene Q).**

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, Ахуген, США) или пробирок для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, 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 ротор прибора заполнен не полностью, то его следует уравновесить. Для этого следует заполнить незанятые места пустыми пробирками (не используйте пробирки от предыдущих экспериментов). Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (не пустой).**

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/ Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
5. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и отметить, что закреплено фиксирующее кольцо. Нажать кнопку **Next/Далее**.
6. 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.**

7. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры амплификации:

**Программа амплификации для приборов роторного типа**

| Цикл | Температура, °C | Время  | Измерение флуоресценции                                   | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|---|-------------------|
| 1    | 50              | 30 мин | –   | 1                 |
| 2    | 95              | 15 мин | –   | 1                 |
| 3    | 95              | 10 с   | –   | 5                 |
|      | 56              | 35 с   | –   |                   |
|      | 72              | 15 с   | –   |                   |
| 4    | 95              | 10 с   | –   | 40                |
|      | 54              | 35 с   | FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson |                   |
|      | 72              | 15 с   | –   |                   |

8. После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да.**
9. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**
- а) осуществлять калибровку по каналам FAM/Green и JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
- б) осуществлять калибрование по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson перед первым измерением (активировать **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/ Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/ Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
- в) установить калибровки для всех каналов от **5FI** до **10FI** (активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Автоматическая оптимизация уровня сигнала**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть.**
10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт.**
11. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
12. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера

исследуемых и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**.

**ВНИМАНИЕ!** При установке типа **None/Пусто** данные образца 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 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/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 (NTC)**) равным 10 %.
6. Исключить циклы / **Eliminate Cycles before – 5**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

| Канал         | Threshold / Порог | More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов | Slope Correct / Коррект. уклона | Eliminate Cycles before/ Исключить циклы |
|---------------|-------------------|---|---------------------------------|--|
| FAM/Green     | 0,03              | 10%   | включена                        | 5  |
| JOE/Yellow    | 0,03              | 10%   | включена                        | 5  |
| ROX/Orange    | 0,03              | 10%   | включена                        | 5  |
| Cy5/Red       | 0,03              | 15%   | включена                        | 5  |
| Cy5.5/Crimson | 0,03              | 5%  | включена                        | 5  |

**ВНИМАНИЕ!** В том случае, если кривые флуоресценции по каналу FAM/Green не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold/Порог Фона - ПФ) равным 20 %.

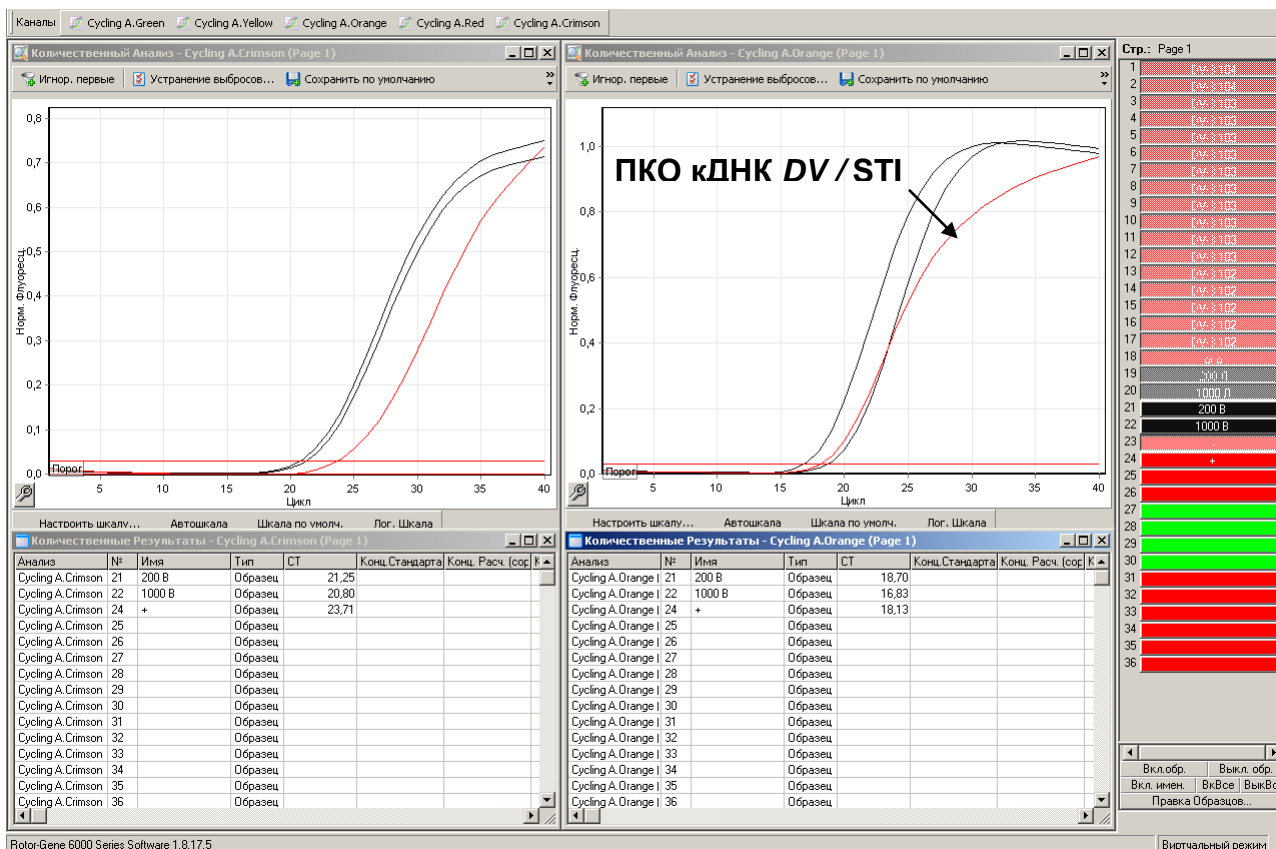
В том случае, если кривые флуоресценции по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold/Порог Фона - ПФ) равным 15-20 %.

### **Интерпретация результатов**

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

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

### Пример амплификации на приборе Rotor-Gene 6000



Пробы 200В и 1000В содержат РНК DV-III



## 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 (детекция через крышку пробирки).

**Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.**

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

### Программа амплификации для приборов планшетного типа

| Цикл                         | Температура, °C | Время  | Измерение флуоресценции        | Кол-во циклов |
|------------------------------|-----------------|--------|--------------------------------|---------------|
| Hold 1/Удерж. темп-ры 1      | 50              | 30 мин | –                              | 1             |
| Hold 2/Удерж. темп-ры 2      | 95              | 15 мин | –                              | 1             |
| Cycling 1/<br>Циклирование 1 | 95              | 10 с   | –                              | 5             |
|                              | 56              | 40 с   | –                              |               |
|                              | 72              | 20 с   | –                              |               |
| Cycling 2/<br>Циклирование 2 | 95              | 10 с   | –                              | 40            |
|                              | 54              | 40 с   | FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar 705 |               |
|                              | 72              | 20 с   | –                              |               |

**ВНИМАНИЕ!** Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec.**

4. Сохранить протокол, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New** и задать имя файла. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой во вкладке **Protocol**, нажав на кнопку **Select Existing...**
5. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.
6. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores**. Выбрать галочками все флуорофоры FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705 и нажать **OK**, затем задать

галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.

7. Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New** и задать имя файла. Выбрав или отредактировав нужную схему планшета, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.
8. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Из вкладки **Start Run** запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки.
9. После окончания программы приступить к анализу результатов.

### Анализ результатов

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов).

1. Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.
2. Поочередно для каждого канала установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) в соответствии с таблицей.

Уровень пороговой линии устанавливается как % от максимального уровня флуоресценции положительного контроля амплификации (**K+**) в последнем цикле амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале.

| Канал                 | Threshold/Порог  |
|-----------------------|--|
| FAM,<br>Cy5           | Для каждого канала установить уровень пороговой линии на 20 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации |
| HEX,<br>ROX,<br>Cy5.5 | Для каждого канала установить уровень пороговой линии на 10 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации |

Кривая флуоресценции K+ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

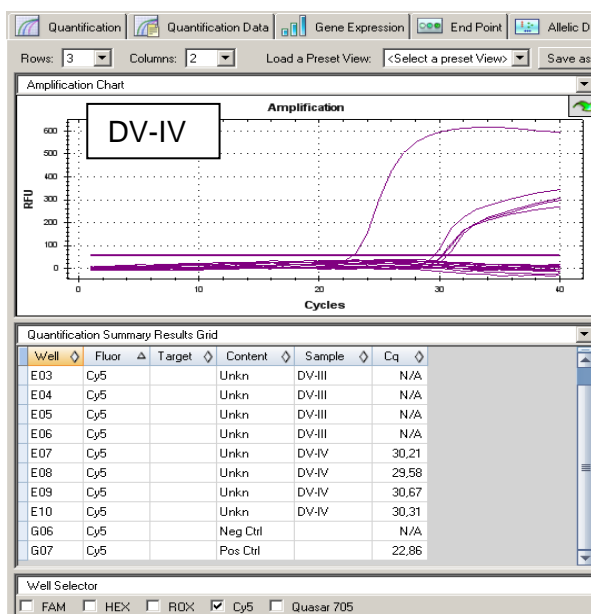
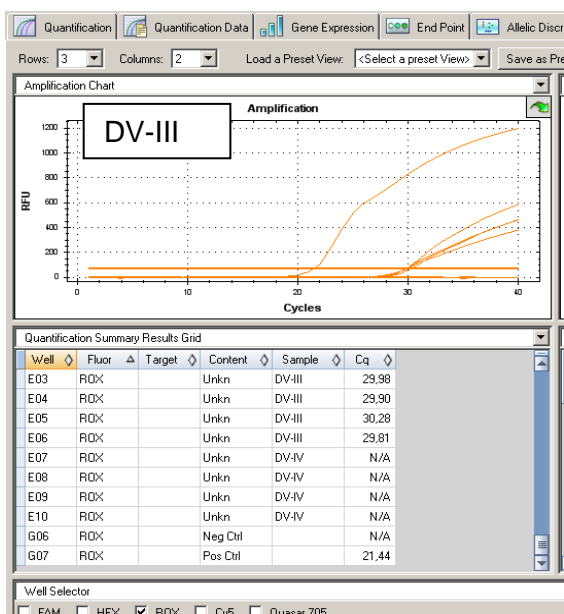
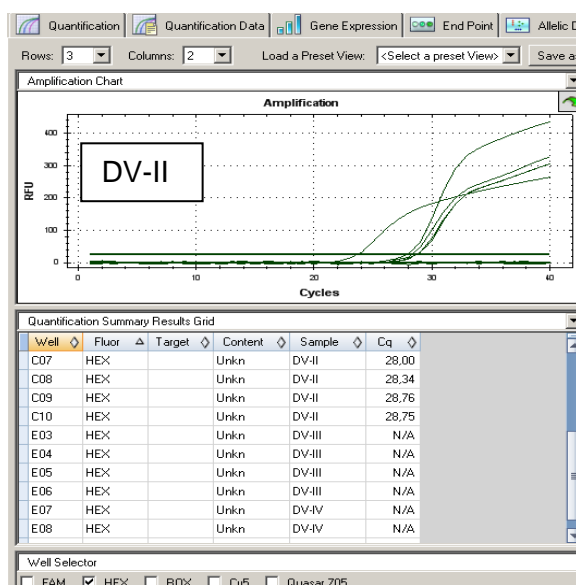
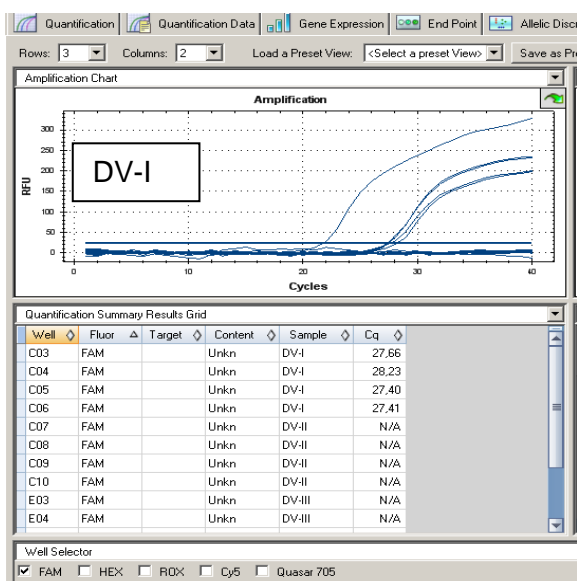
3. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.

## Интерпретация результатов

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

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

## Пример амплификации на приборе CFX96



### ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналам для флуорофоров FAM, HEX, ROX, Cy5 отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (В-) по какому-либо из каналов для флуорофоров FAM, HEX, ROX, Cy5 определено значение порогового цикла  $C_t$ , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на данном канале или каналах.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР (К-) по какому-либо из каналов для флуорофоров FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705 определено значение порогового цикла  $C_t$ , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на каком-либо из каналов с постановкой К- не менее чем в трех повторах.