

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для типирования (идентификации субтипов H5, H7, H9) вирусов

гриппа А (*Influenza virus A*) в биологическом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-H5, H7, H9-FL»

Формат FRT

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ, iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).....	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	18

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для типирования (идентификации) субтипов H5, H7, H9 вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в культурах вируса гриппа в биологическом материале, содержащем РНК вирусов гриппа А, «АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-H5, H7, H9-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

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

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000/для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/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 объемом 0,1 мл (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/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
5. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**), и отметить, что вы не используете пробирки с круглыми крышками (Rotor-Gene 3000) / закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
6. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси:

Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл для варианта FRT-50 F, 30 мкл для варианта FRT. 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 в соответствии с программой амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-50 F)	–	1
Cycling 1 / Циклирование 1	95	10 с	–	10
	54	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling 2 / Циклирование 2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 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..** В открывшемся окне:
- а) для оптимизации измерения сигнала по выбранным каналам установить калибровку от **5FI** до **10FI** для всех каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange. Для этого нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых)** в открывшемся для первого канала окне (**Auto Gain Optimisation Channel Settings/Auto Gain Calibration Channel Settings/Установки Авто-оптимизации уровня сигнала**) указать в строке **Target Sample Range/Нужный диапазон стартового сигнала** значения минимального и максимального сигнала, нажать кнопку **OK**. Автоматически откроется окно для следующего канала. Проверить выбранные для всех каналов значения можно в графах **Min Reading/Миним. Сигнал, Max Reading/Максим. Сигнал.**

- б) калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - в) установить калибровки каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). 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/до запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**. Для внесения изменений в названия образцов надо использовать кнопку **«Edit samples»/«Правка образцов»** (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Тип** как **Unknown/Образец**.

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

Анализ результатов:

Результаты амплификации кДНК *Influenza virus A H5* детектируются по каналу FAM/Green, кДНК *Influenza virus A H7* – по каналу JOE/Yellow, кДНК *Influenza virus A H9* – по каналу ROX/Orange.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A H5*:

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM (Cycling A. Green** для прибора Rotor-Gene 6000), **Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.
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 **Quantitation Results/Количественные результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации кДНК Influenza virus A H7:

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE (Cycling A. Yellow)** для прибора «Rotor-Gene» 6000), **Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.
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 **Quantitation Results/Количественные результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации кДНК Influenza virus A H9:

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX (Cycling A. Orange)** для прибора «Rotor-Gene» 6000), **Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.
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 **Quantitation Results/Количественные результаты**) появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного и положительного контролей амплификации в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций

(см. инструкцию) и граничными значениями C_t , указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

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

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

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

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

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

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

2. Открыть программу iCycler iQ/ iQ5.
3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

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

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE** и **ROX**:
 - для прибора **iCycler iQ5** 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** для варианта **FRT-50 F**, **30 мкл** для варианта **FRT**, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам **FAM, JOE** и **ROX**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
 - для прибора **iCycler iQ** в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop** 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-490, JOE-530 и ROX-575**. 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**.

2. Задать программу амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold / Удерж. темп-ры	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-50 F)	–	1
Cycling 1 / Циклирование 1	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, JOE, ROX	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать 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 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** 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**.

3. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета и запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета.
 - для прибора **iCycler iQ5** необходимо проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
 - для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** необходимо проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – **25 мкл** для варианта **FRT-50 F**, **30 мкл** для варианта **FRT**. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
4. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов:

Результаты амплификации кДНК *Influenza virus A H5* детектируются по каналу FAM, кДНК *Influenza virus A H7* - по каналу JOE, кДНК *Influenza virus A H9* – по каналу ROX.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A H5*:

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

пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, активировать кнопку **Results**.

Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать символ канала **FAM-490**. 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**. Установить уровень пороговой линии (перетащив ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на уровне 10 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A H7:*

Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**, отключив кнопку **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.

Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** 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 символ канала **JOE-530**. 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**. Установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на уровне 10 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов

появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A H9*:

Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **ROX**, отключив кнопку **JOE**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.

Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** 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 символ канала **ROX-575**. 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**. Установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на уровне 10 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного и положительного контролей амплификации 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.

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

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

1. Включить прибор и запустить программу **RealTime_PCR v.7.3**. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – отметить галочкой образец;
 - **Контроли** – нет;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл для варианта FRT-50 F, 30 мкл для варианта FRT;
 - **Флуорофоры** – Fam – специфика; Hex – специфика; Rox – специфика.
4. Задать программу амплификации с применением команды **Создать новую программу/редактировать программу** (см. табл. 3).

Программа амплификации

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold /Удерж. темп-ры	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-50 F)	–	1
Cycling 1 / Циклирование 1	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, JOE, ROX	
	72	25 с	–	

- Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать соответствующее название теста, указать количество образцов и нажать **ОК**.
- Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, в окне **Свободное заполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
- Указать **Объем рабочей смеси – 25 мкл** для варианта **FRT-50 F**, **30 мкл** для варианта **FRT** и нажать кнопку **Запуск программы**.
- 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! Необходимо следить за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивать стрипы при установке в прибор.
- Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы, на каждом из используемых каналов, 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.

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 %**, **Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 10 %**, **верхняя граница/порог нормализации данных – 10 %**. Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку **Применить**.
5. Поочередно для каналов Fam, Hex, Rox установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на уровне 10 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для ПКО показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
6. 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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного и положительного контролей амплификации 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.

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 оптически прозрачными крышками или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

Программирование амплификатора:

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 программу амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 4). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл** для варианта **FRT-50 F**, **30 мкл** для варианта **FRT**.

Таблица 4

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-50 F)	–	1
Cycling 1 / Циклирование 1	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, HEX, ROX	
	72	25 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....**

Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.

5. 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 флуорофоры (FAM, HEX, ROX), используемые в данной постановке, и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, подтверждая название каждого образца кнопкой **Load**.
6. 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.
7. 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.
8. 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 C_t в соответствующей графе в таблице результатов).

Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.

Для всех каналов FAM, HEX и ROX уровень пороговой линии необходимо установить (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для ПКО показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного и положительного контролей амплификации в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций

(см. инструкцию) и граничными значениями C_t , указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

- В исследуемом образце **идентифицирован вирус гриппа А субтип Н5**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- В исследуемом образце **идентифицирован вирус гриппа А субтип Н7**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- В исследуемом образце **идентифицирован вирус гриппа А субтип Н9**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу ROX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- Если в исследуемом образце отсутствуют значения C_t по заданному каналу детекции, следует считать, что в этом образце данный субтип вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение порогового цикла C_t по соответствующему каналу превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца. При повторении результатов или получении значения C_t менее порогового цикла, образец следует считать положительным.

Возможные ошибки

Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о

других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.

Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контрольного образца и для отрицательного контроля ПЦР (К-) (на любом из каналов) 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.