

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения ДНК  
цитомегаловируса человека (CMV) в клиническом материале  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL»**

**Формат FRT**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ NUCLISENS EASYMAG .....	4
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ ROTOR-GENE 3000/6000 (CORBETT RESEARCH, АВСТРАЛИЯ) И ROTOR-GENE Q (QIAGEN, ГЕРМАНИЯ).....	7
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LINEGENE 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, КИТАЙ).....	12
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА ICYCLER IQ5 (BIO-RAD LABORATORIES, INC. («БИО-РАД ЛАБОРАТОРИЗ, ИНК.»), США).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (BIO-RAD LABORATORIES, INC. (БИО-РАД ЛАБОРАТОРИЗ, ИНК.), США).....	17
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА MX3000P/MX3005P (STRATAGENE, США).....	21
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», РОССИЯ) .....	24
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ .....	28
РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК CMV .....	29

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (СМV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® СМV-скрин/монитор-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия),
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай),
- iCycler iQ5 (Bio-Rad, США),
- CFX96 (Bio-Rad, США),
- «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия),
- Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США),

а также совместно с автоматической станцией для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция).

### 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

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

## ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ NucliSENS easyMAG

**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 РНК/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 (установить **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 и положительный 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 объемом 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 **буфером для лизиса NucliSens** и **ВКО STI-87**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с 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**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК CMV и ДНК человека**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 минут при комнатной температуре.

9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens** (bioMeriueх), интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с 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.  
Пробирки с ДНК-пробами перенести в зону ПЦР-амплификации.

**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 фильтром.
6. Для отрицательного контроля (ОК) в пробирку, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл ОК**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОК** и **10 мкл ПК ДНК CMV и ДНК человека**.
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 <b>ВКО STI-87</b> (мкл)
<b>1</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>24</b> (полная загрузка прибора)	<b>250</b> (с запасом на 25 проб)	<b>250</b> (из двух пробирок)

8. Содержимое пробирки тщательно перемешать. Смесь магнитной силики NucliSens с BKO 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, BKO STI-87 на вортексе до однородного состояния.
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **20 мкл смеси**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью многоканальной пипетки отдельными наконечниками с фильтром на 200 мкл.
13. Запустить на приборе программу продолжения экстракции ДНК.
14. После окончания экстракции ДНК извлечь пробирки из прибора. Пробирки с ДНК-пробами перенести в зону ПЦР-амплификации.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРОГОВОГО ЗНАЧЕНИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РЕЗУЛЬТАТА

Перед началом работы с новой серией реагентов следует определить порог ( $C_t$ ) для положительных образцов по каналу JOE/HEX/Yellow для каждого конкретного прибора. Развести ПКО ДНК *CMV* и ДНК человека в 100 раз РНК-буфером (например, взять 990 мкл РНК-буфера и 10 мкл ПКО ДНК *CMV* и ДНК человека). Провести ПЦР-амплификацию разведенного образца в пяти повторах по инструкции к набору реагентов. Для прибора Rotor-Gene 3000/6000 выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог фона – ПФ (NTC)** равным 0%). Рассчитать среднее  $C_t$  для пяти повторов по каналу JOE/HEX/Yellow. Добавить к среднему  $C_t$  2 цикла. Полученное число будет являться пороговым значением положительного результата. Пример представлен в табл. 1.

Таблица 1

#### Пример расчета порогового значения положительного результата

	$C_t$ (JOE/HEX/Yellow)	Среднее значение	Порог для положительных образцов
ПКО ДНК <i>CMV</i> и ДНК человека, разведенный в 100 раз	27,15	27,5	29,5
	27,28		
	28,06		
	27,69		
	27,27		

## ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

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) (детекция через дно пробирки).

### Программирование амплификатора

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

**ВНИМАНИЕ!** Если вы не полностью заполняете ротор прибора, то его следует уравновесить. Для этого заполните незанятые места пустыми пробирками (*не используйте пробирки от предыдущих экспериментов*). Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

### Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**), и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками (Rotor-Gene 3000)/закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку

**Next/Далее.**

5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации.

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

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

6. После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.:**
- осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
  - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
  - для установки калибровки всех каналов нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал – 5, Max Reading/Максим. Сигнал – 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
10. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», положительный – «К+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC**.



Для калибраторов – тип **Standard/Стандарт** и указать их концентрации в столбце **Given Conc**. Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше к набору реагентов. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

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

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

концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**) (количественный тест).

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

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

### **Анализ результатов амплификации ВКО STI-87 (канал ROX/Orange)**

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа

**Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.

- Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог=0.03**.
- Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
- В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) должны появиться значения **Ct** для **ДНК ВКО STI-87** в каждом исследуемом образце, а для количественных тестов – значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**). При этом значение **Ct** не должно превышать значение, указанное во вкладыше.
- В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – значение **Ct** должно быть менее указанного во вкладыше.
- В отрицательном контроле ПЦР (К–) – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений **Ct**.
- В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК CMV и ДНК человека** – значение **Ct** должно быть менее указанного во вкладыше, а для количественного теста должно быть определено значение концентрации.
- В положительном контроле ПЦР (К+) – **KSG2** – значение **Ct** должно быть менее указанного во вкладыше (качественный тест).
- В ДНК-калибраторах – **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения **Ct** и значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**) (количественный тест).

### **Интерпретация результатов**

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

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

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

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

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

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

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

1. Включить прибор, запустить программу iQ5

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

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

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

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

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать соответствующие параметры амплификации.

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

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

3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.

5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-». Калибраторы по каналу **JOE/HEX** и **FAM** и **ROX** задать как **Standard** и указать концентрацию из вкладыша к набору реагентов. При задании калибраторов кнопка **Whole Plate Loading** должна быть не активирована. Для всех образцов и калибраторов задать измерение флуоресценции по трем каналам JOE/HEX, FAM, ROX.
6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

### Анализ данных

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого в модуле **Workshop** нажать **Data file** и выбрать файл данных. Перейти в режим **Data Analysis**.
2. Просматривайте данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысьте уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговых линий (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов. В таблице результатов (окно **Quant. Results**) появятся значения *Ct* для анализируемого канала.
4. Для анализа результатов нажать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

### Анализ результатов амплификации CMV (канал JOE/HEX)

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

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

значений указанный во вкладыше.

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

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

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

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

### **Анализ результатов амплификации ВКО STI-87 (канал ROX)**

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

1. В таблице результатов должны появиться значения *Ct* для **ДНК ВКО STI-87** в каждом исследуемом образце и отрицательном контроле экстракции (ОК), а для количественных тестов – значения концентраций (copies/reaction). При этом значение *Ct* не должно превышать значение, указанное во вкладыше.
2. В отрицательном контроле экстракции (ОК) – **ОКО** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше.
3. В отрицательном контроле ПЦР (К-) – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
4. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК CMV и ДНК человека** – значение *Ct* должно быть менее указанного во вкладыше, а для количественного

теста должно быть определено значение концентрации.

5. В ДНК-калибраторах **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (copies/reaction) (для количественных тестов).

### **Интерпретация результатов**

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

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



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

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

### Программирование амплификатора

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

### Создание шаблона для проведения теста

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Анализ результатов**

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

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

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

3. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов и концентрации калибраторов.

Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

4. В таблице результатов появятся значения *Ct* для **ДНК CMV** (по каналу HEX), **ДНК BKO Glob** (по каналу FAM), **ДНК BKO STI-87** (по каналу ROX), а для **Формат FRT Форма 2: [REF] R-V7-100-S(RG,iQ,Mx); [REF] H-0852-1-1 / [VER] 30.03.21 / стр. 19 из 30**

количественных тестов – значения концентраций (copies/reaction). По каналам FAM и ROX значение  $C_t$  для исследуемых образцов должно быть менее указанного во вкладыше.

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

#### **Интерпретация результатов**

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

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

## ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США)

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

1. Включите прибор, запустите программу Stratagene Mx3000P/Mx3005P.
2. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установите флажок **Turn lamp on for warm-up**.

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

3. Установите пробирки в прибор, закройте крышку.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **HEX/JOE filter set** установить параметр JOE, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр FAM, напротив **ROX filter set** – ROX.

**ВНИМАНИЕ!** Будьте внимательны! Не переворачивайте стрипы при установке в прибор.

5. Закрыть фиксатор и дверцу прибора.
6. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.
7. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
  - а) выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью).
  - б) Обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить три флажка **FAM**, **JOE** и **ROX**. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Information**). Внести подписи образцов так же можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.

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

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

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

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

**Самостоятельное программирование**

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

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

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

2. Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data collection marker by dragging** и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.
3. Запустить амплификацию, нажав кнопку **Run**, затем **Start** и присвоив имя файлу эксперимента.

**Анализ данных**

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (для количественного анализа).
2. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
3. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок), в противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.
4. Перейти на вкладку **Results**.
5. Убедиться, что три флуоресцентных канала активны (кнопки **JOE**, **FAM**, **ROX** нажаты в поле **Dyes Shown** внизу окна программы).

6. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив трех флуоресцентных каналов: **JOE/HEX**, **FAM**, **ROX**. Проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысьте уровень порога.  
(По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, дважды необходимо щелкнуть левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties** для оси Y (Y axis) поставить галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**).
7. В таблице результатов появятся значения  $C_t$  для **ДНК CMV** (по каналу JOE/HEX), **ДНК ВКО Glob** (по каналу FAM), **ДНК ВКО STI-87** (по каналу ROX), а для количественных тестов – значения концентраций (copies/reaction). По каналам FAM и ROX значение  $C_t$  для исследуемых образцов должно быть менее указанного во вкладыше.
8. В отрицательном контроле экстракции (OK) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений  $C_t$  по каналу FAM и JOE/HEX; значение  $C_t$  должно быть менее указанного во вкладыше по каналу ROX.
9. В отрицательном контроле ПЦР (K-) – **РНК-буфер** не должно быть каких-либо значений  $C_t$  по каналам FAM, JOE/HEX и ROX.
10. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК CMV и ДНК человека** – значение  $C_t$  должно быть менее указанного во вкладыше по всем каналам, для количественного теста расчетное значение концентрации должно укладываться в диапазон значений, указанный во вкладыше.
11. В ДНК-калибраторах – **KSG1** и **KSG2** – должны появиться значения  $C_t$  и значения концентраций (copies/reaction) по всем каналам (количественный тест).

### Интерпретация результатов

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

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

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

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

### Программирование амплификатора

1. Включить прибор, запустить программу RealTime\_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.

### Создание шаблона для проведения теста

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



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

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

Примечание – Каналы **Sy5** и **Sy5.5** включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

- В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
  - Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**АмплиСенс-1**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
  - Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
  - В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
  - Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
- ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.
- Последовательно нажать кнопки **Закрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.


#### Использование готового шаблонного файла для проведения теста

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

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


### Анализ результатов

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

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс для версии программы v.7.5. и выше)**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
  - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
  - **Критерии достоверности результата: поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 10 %, верхняя граница/порог нормализации данных – 10 %.**
  - **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).Нажать кнопку **Применить**.

5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки Ф (отжать кнопку)**.
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные

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

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

### **Интерпретация результатов**

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

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

## ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Наличие любого значения  $C_t$  в таблице результатов по каналу ROX/Orange для отрицательного контроля ПЦР (K-), по каналам FAM/Green и JOE/HEX/Yellow для отрицательного контроля ПЦР (K-) и отрицательного контроля экстракции (OK) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае следует повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если при проведении качественного теста значение  $C_t$  в таблице результатов для положительного контроля (K+) ПЦР (**KSG2**) по каналам JOE/Yellow/HEX (CMV), FAM/Green или ROX/Orange отсутствует или более порогового – необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК CMV.
3. Если значение  $C_t$  в таблице результатов для положительного контроля экстракции (ПК) **ПКО ДНК CMV и ДНК человека** по каналам JOE/Yellow/HEX (CMV), FAM/Green или ROX/Orange отсутствует или более порогового – результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов с этапа ПЦР.
4. Если для данного образца по каналу JOE/Yellow/HEX не определено значение порогового цикла  $C_t$  или определено выше порога, заданного во вкладыше, и по каналу FAM/Green или ROX/Orange получено значение  $C_t$ , превышающее максимальное значение, приводимое для ВКО – необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа экстракции. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или наличие ингибиторов ПЦР.
5. Если для данного образца по каналу JOE/Yellow/HEX определено значение  $C_t$  выше порога, заданного во вкладыше, а по каналу FAM/Green или ROX/Orange получено значение  $C_t$ , менее порогового, то результат считается сомнительным. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения  $C_t$  – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается сомнительным.
6. Если при проведении количественного теста значения копий на реакцию в калибраторах более чем на 30 % отличаются от заданных – необходимо проверить порядок размещения пробирок в роторе (калибраторы должны находиться в ячейках, соответствующих названию **Standard** в таблице образцов, концентрация образцов должна соответствовать, концентрации, указанной во вкладыше, а для

приборов роторного типа лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (не пустой).

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

## РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК CMV

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

$$\lg \left\{ \frac{\text{число копий ДНК CMV в ПЦР-пробе}}{\text{число копий ДНК Glob в ПЦР-пробе}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right\} = \lg (\text{копий ДНК CMV} / 10^5 \text{ клеток})$$

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

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

Расчет концентрации ДНК CMV на мл образца при экстракции ДНК из цельной крови, плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом проводится по формуле:

$$\text{КК ДНК CMV} = (\text{КДНК CMV} / \text{КСТИ-87}) \times \text{коэффициент ВКО (копий ДНК CMV/мл)}$$

**К ДНК CMV** – количество копий ДНК CMV в ДНК-пробе;

**КСТИ-87** – количество копий ДНК STI-87 в ДНК-пробе;

**коэффициент ВКО** – соответствует числу копий ВКО ДНК STI-87 в мл и указан во вкладыше к каждой серии наборов реагентов и специфичен для каждого лота.

**ВНИМАНИЕ!** Набор реагентов «АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL» валидирован относительно международного стандарта ВОЗ – 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification techniques NIBSC code 09/162, version 3.0, 30/11/2010 (Великобритания). Коэффициент пересчета ДНК CMV копии/мл в МЕ/мл для набора реагентов «АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL» равен 0,6.

$$1 \text{ МЕ ДНК CMV/мл} = 1,67 \text{ копий ДНК CMV/мл}$$

Расчет концентрации ДНК *CMV* в образцах плазмы периферической крови, цельной крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа в МЕ ДНК *CMV*/мл проводится по формуле:

$$\frac{\text{К ДНК } CMV}{\text{К STI-87}} \times \frac{\text{коэффициент ВКО (копий/мл)}}{CMV/мл} \times 0,6 = \text{МЕ ДНК}$$

**К ДНК *CMV*** – количество копий ДНК *CMV* в ДНК-пробе;

**К STI-87** – количество копий ДНК STI-87 в ДНК-пробе;

**коэффициент ВКО** – соответствует числу копий ВКО ДНК STI-87 в мл и указан во вкладыше к каждой серии наборов реагентов и специфичен для каждого лота.