

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления провирусной ДНК вируса
иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL»

Формат FRT



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, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США).....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США)	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).....	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США)	23

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 2 из 25

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) путем амплификации специфического фрагмента провирусной ДНК методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» «АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

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

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

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** НК1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** НК1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** НК7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 3 из 25

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene 6 версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q – русифицированную программу Rotor-Gene 6000 версии 1.8.17.5 (или выше) или 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 / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

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

Поместить микропробирки в ячейки ротора прибора Rotor-Gene 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).

Программирование амплификатора

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**), и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками (Rotor-Gene 3000)/одето фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 50 мкл. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры.

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 4 из 25

**Программа амплификации
«АмплиСенс ДНК-ВИЧ» для приборов роторного типа**

Этап	Температура а °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling1/ Циклирование1	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
Cycling2/ Циклирование2	95	20 с	–	40
	55	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	30 с	–	

6. Нажать кнопку **ОК/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 (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - установка калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). 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 и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**.

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

Анализ результатов

Анализируют результаты амплификации участка ДНК ВИЧ-1 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка провирусной ДНК ВИЧ-1 детектируется по каналу JOE/Yellow, а накопление продукта амплификации ДНК ВКО – по каналу для

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** НК1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** НК1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** НК7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 5 из 25

детекции флуорофора FAM/Green.

Анализ результатов амплификации ВКО (эндогенный внутренний контроль)

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**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации ДНК ВИЧ-1

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

ВНИМАНИЕ! В редких случаях слабopоложительные образцы имеют низкие разгорания флуоресценции и становятся отрицательными при установке устранения выбросов в 5 %. В таком случае допускается понизить данный параметр и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным 2 %.

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 6 из 25

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

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу JOE/Yellow	по каналу FAM/Green
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует или определено значение больше граничного
ПК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- **ДНК ВИЧ-1 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow (ДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, и в таблице результатов по каналу FAM/Green (ВКО) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение.
- **ДНК ВИЧ-1 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow (ДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла *Ct* не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу FAM/Green (ВКО) определено значение порогового цикла *Ct* не превышающее, указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green (ВКО) значение порогового цикла *Ct* не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение.

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 7 из 25

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Если в пробе с положительным контролем экстракции ДНК отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки при экстракции ДНК. Необходимо провести экстракцию еще раз.
2. Если в пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.
3. Если для данного образца, не определено значение порогового цикла *Ct* по каналу FAM/Green (ВКО) или получено значение *Ct*, превышающее указанное (граничное) значение. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа для данного образца, начиная с этапа экстракции.
4. Если в отрицательном контроле (экстракции или ПЦР) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

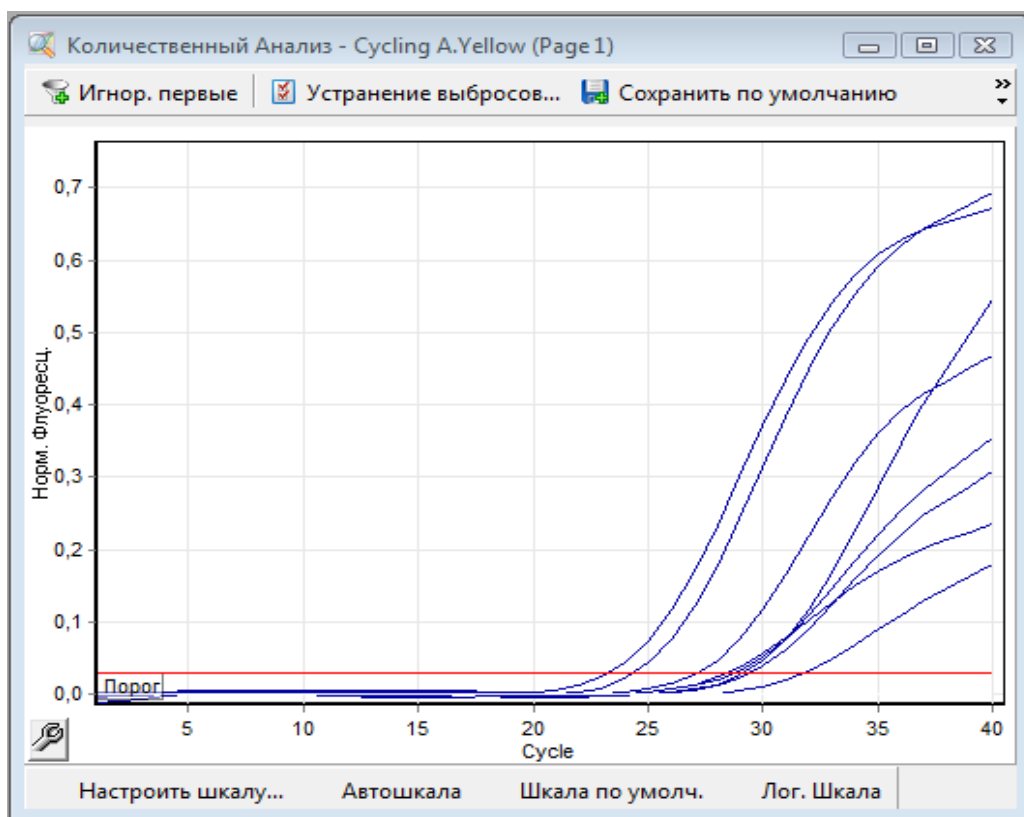
Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

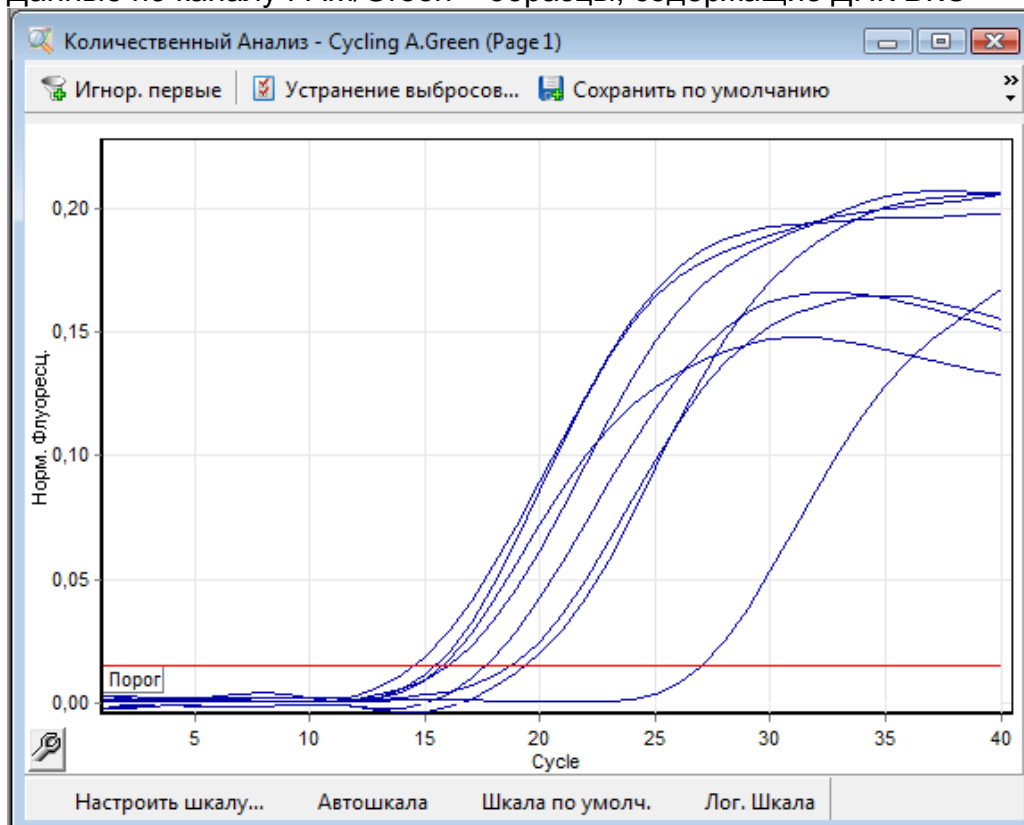
Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 8 из 25

Примеры полученных результатов

Данные по каналу JOE/Yellow – образцы, содержащие ДНК ВИЧ-1



Данные по каналу FAM/Green – образцы, содержащие ДНК ВКО



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 9 из 25

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США)

1. Включить прибор, запустить программу iQ5.

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

2. Поместить микропробирки или стрипы (часть плашки) или плашку в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Следить 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 переворачивать стрипы/плашку 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 параметры амплификации.

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс ДНК-ВИЧ» для приборов планшетного типа (за исключение приборов фирмы «ДНК-технология»)

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
3	95	20 с	–	42
	55	40 с	FAM, JOE/HEX	
	72	30 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**, для всех образцов задать измерение флуоресценции по двум каналам: **FAM, HEX**.

6. Задать объем реакции **Sample Volume 50** мкл, тип крышек (**Domed Cap**), тип пробирок (**Tubes**). Амплификацию необходимо проводить с использованием такого же типа пластика, в котором проводилась калибровка прибора. Сохранить схему планшета.

7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 10 из 25

Анализ результатов

Анализируют результаты амплификации участка провирусной ДНК ВИЧ-1 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка ДНК ВИЧ-1 детектируется по каналу JOE/HEX, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора FAM. Рекомендуется результаты, полученные на приборе iCycler iQ, анализировать при помощи программного обеспечения прибора iQ5.

Обработка 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. Просмотреть данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить 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.
4. Для анализа результатов активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct	
		по каналу JOE/HEX	по каналу FAM
OK	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует или определено значение больше граничного
ПК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 11 из 25

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- **ДНК ВИЧ-1 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX (ДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение, и в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение.
- **ДНК ВИЧ-1 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX (ДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла C_t не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла C_t не превышающее, указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) значение порогового цикла C_t не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Если в пробе с положительным контролем экстракции ДНК отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки при экстракции ДНК. Необходимо провести выделение еще раз.
2. Если в пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.
3. Если для данного образца, не определено значение порогового цикла C_t по каналу FAM (ВКО) или получено значение C_t , превышающее указанное значение. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа для данного образца, начиная с этапа экстракции.
4. Если в отрицательном контроле (выделения или ПЦР) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными.

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

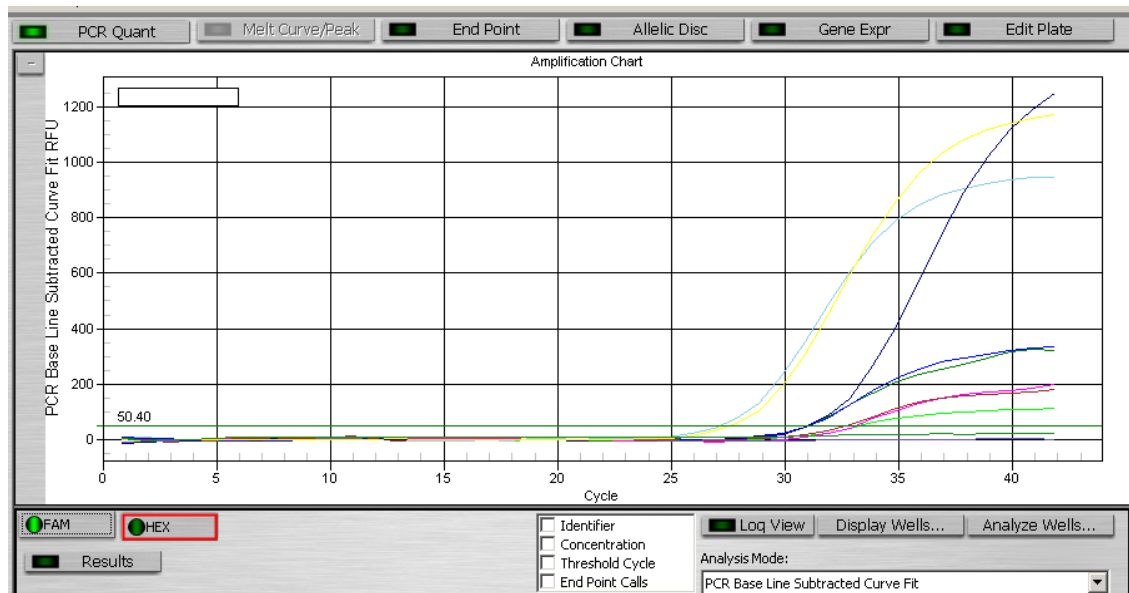
Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 12 из 25

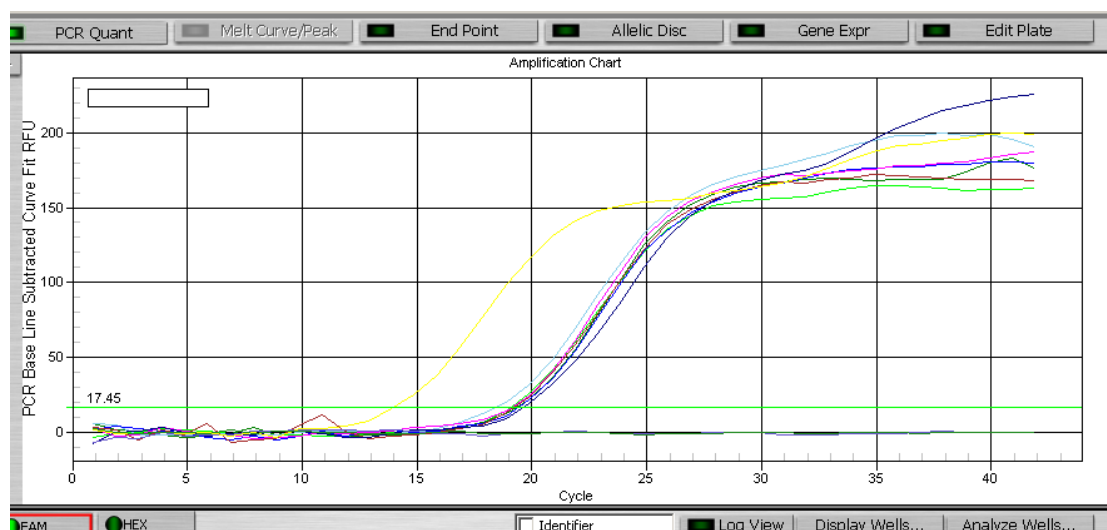
Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Примеры полученных результатов

Данные по каналу JOE/HEX – образцы, содержащие ДНК ВИЧ-1:



Данные по каналу FAM – образцы, содержащие ДНК ВКО:



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 13 из 25

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США)

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

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

3. Установить пробирки в прибор, закрыть фиксатор и дверцу прибора.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **FAM filter set** установить параметр **FAM**, напротив **HEX/JOE filter set – JOE**.
5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки или стрипы и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры **FAM, JOE**.
6. В окне **Well Information** внести имя для каждого исследуемого образца.
7. На вкладке **Plate Setup** задать параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки, и в выпадающем меню **Well type** выбрать **Unknown** и поле **Collect fluorescence data**. Отметить флуорофоры **FAM, JOE**.
8. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации.

Таблица 5

Программа амплификации «АмплиСенс ДНК-ВИЧ» для приборов планшетного типа (за исключение приборов фирмы «ДНК-технология»)

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
3	95	20 с	–	42
	55	40 с	FAM, JOE/HEX	
	72	30 с	–	

9. Запустить программу амплификации, нажав кнопку **Run**, затем **Start**, и ввести имя файла.

Анализ результатов

Анализируют результаты амплификации участка провирусной ДНК ВИЧ-1 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка ДНК ВИЧ-1 детектируется по каналу

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF НК1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF НК1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF НК7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 14 из 25

JOE/HEX, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора FAM.

Обработка результатов

1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок).
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Для каждого канала проверить 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, необходимо повысить уровень порога. Для этого в нижней панели **Dyes shown** активировать отображение каждого флуоресцентного канала в отдельности, просмотреть положение линии порога, и, при необходимости, изменить.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 6).

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу JOE/HEX	по каналу FAM
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует или определено значение больше граничного
ПК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- **ДНК ВИЧ-1 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX (ДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, и в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 15 из 25

указанное граничное значение.

- **ДНК ВИЧ-1 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX (ДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла C_t не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла C_t не превышающее, указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) значение порогового цикла C_t не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение.

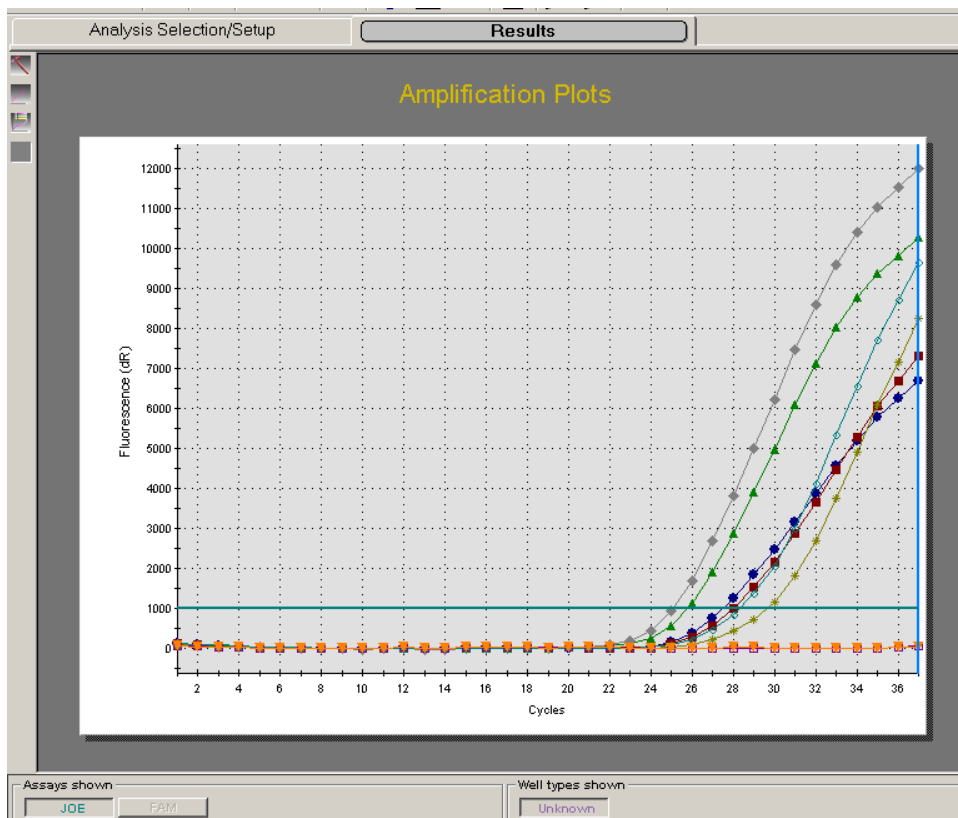
ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

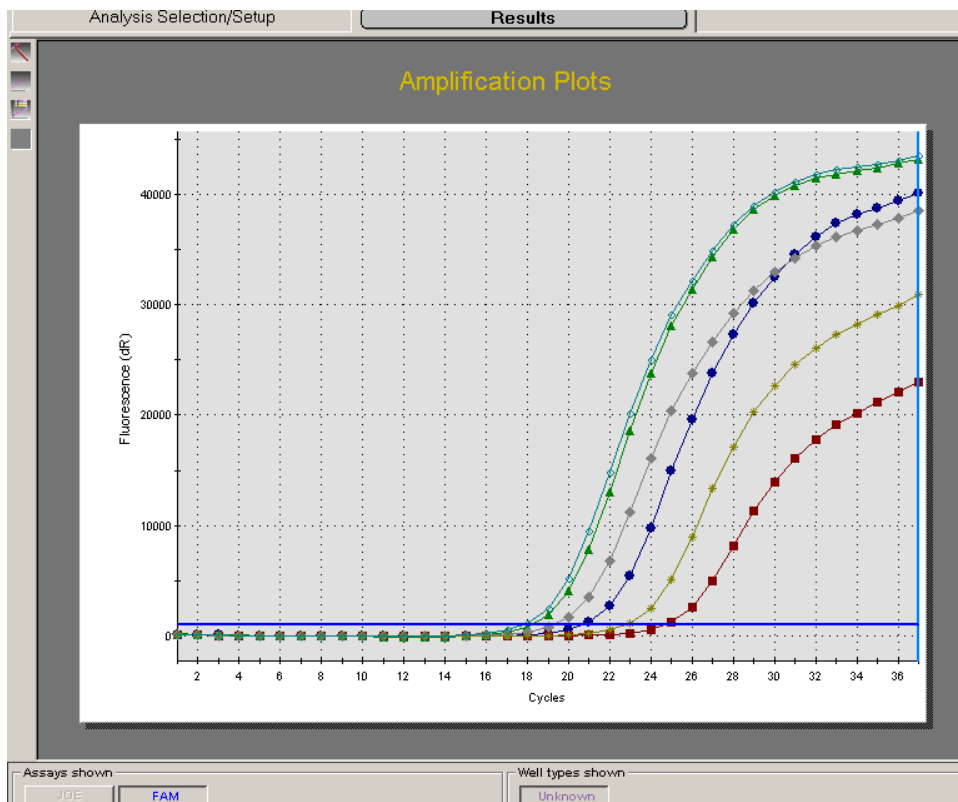
1. Если в пробе с положительным контролем экстракции ДНК отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки при экстракции ДНК. Необходимо провести экстракцию еще раз.
2. Если в пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.
3. Если для данного образца, не определено значение порогового цикла C_t по каналу FAM (ВКО) или получено значение C_t , превышающее указанное значение. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа для данного образца, начиная с этапа экстракции.
4. Если в отрицательном контроле (экстракции или ПЦР) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Примеры полученных результатов

Данные по каналу JOE/HEX – ДНК ВИЧ-1:



Данные по каналу FAM – ВКО:



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 17 из 25

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов.

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 – **HIV-DNA** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный
 - **Метод** – Пороговый (Ct)
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль –
 - **Контроли**: положительный (К+) – 1 , отрицательный (К-) – 1.
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 50 мкл
 - **Флуорофоры** – Fam – ВК; Hex – специфика.
 - Задать программу амплификации и нажать **ОК**.

Таблица 7

Программа амплификации «АмплиСенс ДНК-ВИЧ»
для приборов планшетного типа фирмы «ДНК-технология»

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
3	95	5 с	–	42
	60	30 с	–	
	55	40 с	Fam, Hex	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **HIV-DNA**, указать количество образцов и нажать **ОК**.
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 18 из 25

6. 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! Следить 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 переворачивать стрипы/плашку при установке в прибор.

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

Анализ результатов

Анализируют результаты амплификации участка провирусной ДНК ВИЧ-1 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка ДНК ВИЧ-1 детектируется по каналу Нех, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора Fam.

Обработка данных

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата ПЦР – 70 %**.
5. Для каждого канала проверить 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, необходимо повысить уровень порога.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 8).

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу Нех	по каналу Fam
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует или определено значение больше граничного
ПК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

- **ДНК ВИЧ-1 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Нех (ДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение, и в таблице результатов по каналу Fam (ВКО) определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение.
- **ДНК ВИЧ-1 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Нех (ДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла C_t не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу Fam (ВКО) определено значение порогового цикла C_t не превышающее, указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Fam (ВКО) значение порогового цикла C_t не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Если в пробе с положительным контролем экстракции ДНК отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки при выделении ДНК. Необходимо провести экстракцию еще раз.
2. Если в пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

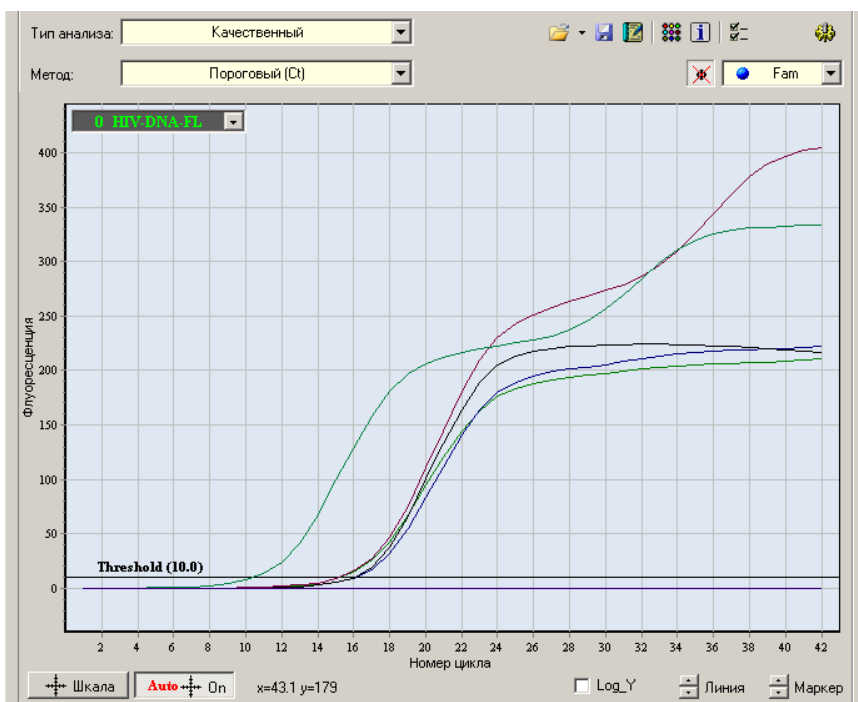
Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 20 из 25

3. Если для данного образца, не определено значение порогового цикла C_t по каналу Fam (ВКО) или получено значение C_t , превышающее указанное значение. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа для данного образца, начиная с этапа выделения.
4. Если в отрицательном контроле (экстракции или ПЦР) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Примеры полученных результатов

Данные по каналу Fam – ВКО:

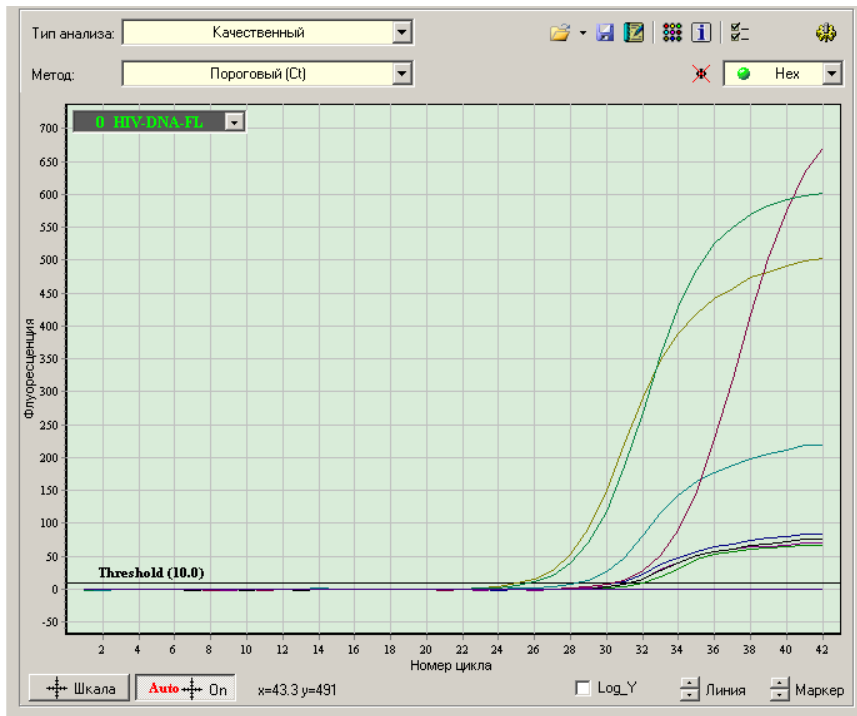


Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 21 из 25

Данные по каналу Hex – ВИЧ:



Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 22 из 25

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, 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 осуществляется через крышку пробирки).

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

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 (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала – см. табл. 9). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 50 мкл**.

Таблица 9

Программа «АмплиСенс ДНК-ВИЧ»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. температуры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	20 с	–	42
	55	40 с	FAM, HEX	
	72	30 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

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0071-1;

Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK1-0072-1;

Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), REF HK7-0073-1 / VER 19.03.21 / стр. 23 из 25

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 флуорофоры, 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.
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. Сохранить эксперимент.
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). Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО;
- по каналу HEX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка провирусной ДНК ВИЧ-1 (ПКО).

1. Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии, используя один из способов:

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V0-G-P1(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0071-1;

Форма 2: **REF** TR-V0-G-P2(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK1-0072-1;

Форма 3: **REF** TR-V0-G-S(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** HK7-0073-1 / **VER** 19.03.21 / стр. 24 из 25

Вариант 1

Поочередно для каждого канала 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.

Вариант 2

Поочередно для каждого канала отметить галочкой **Log Scale**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер.

2. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, возможно в появившемся окне задать название образцов.
3. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.