

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) и
идентификации субтипа H5N1 в биологическом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Influenza virus A H5N1-FL*»

Вариант FRT

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)	5
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	12
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ или iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).	13
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА SmartCycler II (SERNEID, США)	22
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).....	27
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)	33

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) и идентификации субтипа Н5N1 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A H5N1-FL*» вариант FRT совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай);
- iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- SmartCycler II (CERHEID, США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

Соответствие наименования ПЦР-смесей-FL, мишеней и каналов детекции

Флуорофор	FAM	JOE
Название канала детекции для разных моделей приборов	FAM / Green	JOE / HEX / R6G / Yellow / Cy3
Наименование ПЦР-смеси-FL	Выявляемая кДНК-мишень	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H5N1</i>	<u>кДНК</u> <i>Influenza virus A H5</i>	<u>кДНК</u> <i>Influenza virus A N1</i>
ПЦР-смеси-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i>	<u>кДНК <i>Influenza virus A</i></u>	кДНК ВКО

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000- программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

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, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

ВЫЯВЛЕНИЕ РНК INFLUENZA VIRUS A.

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню **Advanced/Детальный мастер** и шаблон запуска эксперимента **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки). Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

**Программа амплификации для приборов Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000
(Corbett Research, Австралия)**

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценц ии	Количес т во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	5 мин (при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT) 15 мин при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	–	1
Cycling1/ Циклирование 1	95	10 с	–	align="center">10
	54	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling2/ Циклирование 2	95	10 с	–	align="center">35
	54	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

- Нажать дважды кнопку **ОК/Да**.
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для канала **FAM/Green** установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 10FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 20FI. Для этого выделить мышкой строку **FAM/Green** в меню и нажать кнопку **Edit/Правка** на правой панели окна. Нажать кнопку **ОК/Да**. Для канала **JOE/Yellow** установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации ВКО.

- Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.

3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **20 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A*.

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. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «*Ct*» в соответствующей графе в таблице результатов).

1. Образец считают положительным, если значение *Ct* на канале FAM/Green менее или равно 33.
2. Образец считают отрицательным, если значение *Ct* на канале FAM/Green отсутствует, а по каналу JOE/Yellow для него определено значение *Ct*, не

превышающее 31.

3. Если значение *Ct* на канале FAM/Green больше 33, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК, и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения *Ct* на канале FAM/Green менее или равного 33. При получении отрицательного результата по каналу FAM/Green образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контрольного образца (на канале FAM/Green) и для отрицательного контроля ПЦР (TE-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение порогового цикла для K+ по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Значение *Ct* в таблице результатов для ВКО (канал JOE/Yellow) отсутствует или более 31: требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СУБТИПА H5N1 INFLUENZA VIRUS A.

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню **Advanced/Детальный мастер** и шаблон запуска эксперимента **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. (Если галочка не стоит в окне по умолчанию поставить ее с помощью мышки). Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

**Программа амплификации для приборов Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000
(Corbett Research, Австралия)**

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресцен ции	Количество во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	5 мин (при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT) 15 мин при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	–	1
Cycling1/ Циклирование 1	95	10 с	–	10
	54	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling2/ Циклирование2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

- Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для каналов **FAM/Green** и **JOE/Yellow** установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Для этого выделить мышкой строку **JOE/Yellow** в меню и нажать кнопку **Edit/Правка** на правой панели окна. Нажать кнопку **OK/Да**. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A N1*.

- Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
- Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).

4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
8. Образец считают положительным, если значение *Ct* на канале JOE/Yellow менее или равно 33.
9. Образец считают отрицательным, если значение *Ct* на канале JOE/Yellow отсутствует. Если значение *Ct* на канале JOE/Yellow больше 33, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК, и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения *Ct* на канале JOE/Yellow менее или равного 33. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A H5*.

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A.Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
8. Образец считают положительным, если значение *Ct* на канале FAM/Green менее

или равно 33.

9. Образец считают отрицательным, если значение C_t на канале FAM/Green отсутствует. Если значение C_t на канале FAM/Green больше 33, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК, и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения C_t на канале FAM/Green менее или равного 33. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Одновременное выявление в пробе положительных сигналов по каналам FAM/Green и JOE/Yellow указывает на наличие в образце *Influenza virus A H5N1* или одновременное наличие в ней нескольких субтипов вируса гриппа, имеющих в своем составе гемагглютинин 5 и нейраминидазу 1 типа.

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контрольного образца (на любом из каналов) и для отрицательного контроля ПЦР (TE-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение порогового цикла для K+ по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

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 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ или 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, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Выявление РНК *INFLUENZA VIRUS A*.

Программирование амплификаторов iCycler iQ, iCycler iQ5:

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

2. Запустить программу iCycler iQ или iCycler iQ5 в зависимости от используемого прибора.
3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя 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 переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Редактируйте схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. Задайте объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохраните заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
- Для прибора «**iCycler iQ**» отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM-490** и **JOE-530**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate**

Setup Filename (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

4. Задать программу амплификации

Программа Gripp для амплификаторов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин (при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT) 15 мин при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, JOE/HEX	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Задайте параметры амплификации и сохраните протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: Cycle 3 – Step 2. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

5. Поместить предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с

заданной схемой.

6. Запустить выполнение выбранной программы **Gripp** с заданной схемой планшета.
 - Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
 - Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
7. После окончания программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для всех каналов FAM, JOE/HEX уровень пороговой линии необходимо установить (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.

Анализ результатов амплификации ВКО:

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE/HEX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Установить уровень пороговой линии. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку

Analyse Data. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A*:

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**, отключив кнопку **JOE/HEX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Установить уровень пороговой линии. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «*Ct*» в соответствующей графе в таблице результатов).

1. Образец считают положительным, если значение *Ct* на канале FAM менее или равно 33.
2. Образец считают отрицательным, если значение *Ct* на канале FAM отсутствует, а по каналу JOE/Yellow для него определено значение *Ct*, не превышающее 31.
3. Если значение *Ct* на канале FAM больше 33, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК, и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения *Ct* на канале FAM менее или равного 33. При

получении отрицательного результата по каналу FAM образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контрольного образца (на канале FAM) и для отрицательного контроля ПЦР (TE-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение порогового цикла для K+ по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
3. Значение *Ct* в таблице результатов для ВКО (канал JOE/HEX) отсутствует или более 31: требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК.

Идентификация субтипа H5N1 INFLUENZA VIRUS A.

Программирование амплификаторов iCycler iQ и iCycler iQ5:

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Запустить программу iCycler iQ или iCycler iQ5 в зависимости от используемого прибора.
3. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE/HEX**.
 - Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Редактируйте схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. Задайте объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохраните заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
 - Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores**

здать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM-490** и **JOE-530**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

4. Задать программу амплификации:

Программа Grip для амплификаторов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США):

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин (при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT) 15 мин при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-50 F	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, JOE/HEX	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Задайте параметры амплификации и сохраните протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: Cycle 3 – Step 2. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить

ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

5. Поместить предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.
6. Запустить выполнение выбранной программы **Grippс** заданной схемой планшета.
 - Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
 - Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
7. После окончания программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «C_t» в соответствующей графе в таблице результатов). Для всех каналов FAM, JOE/HEX уровень пороговой линии необходимо установить (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.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A N1*.

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

пороговой линии. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.

- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyse Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.
- Образец считают положительным, если значение **Ct** на канале JOE/HEX менее или равно 33.
- Образец считают отрицательным, если значение **Ct** на канале JOE/HEX отсутствует. Если значение **Ct** на канале JOE/HEX больше 33, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения **Ct** на канале JOE/HEX менее или равного 33. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A H5*.

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**, отключив кнопку **JOE/HEX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Установить уровень пороговой линии. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.
- Образец считают положительным, если значение **Ct** на канале FAM менее или

равно 33.

- Образец считают отрицательным, если значение C_t на канале FAM отсутствует. Если значение C_t на канале FAM больше 33, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения C_t на канале FAM менее или равного 33. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Одновременное выявление в пробе положительных сигналов по каналам FAM и JOE/HEX указывает на наличие в образце *Influenza virus A H5N1* или одновременное наличие в ней нескольких субтипов вируса гриппа, имеющих в своем составе гемагглютинин 5 и нейраминидазу 1 типа.

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контрольного образца и для отрицательного контроля ПЦР (TE-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение порогового цикла для K+ по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА SmartCycler II (CERNEID, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов при использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант **FRT-50 F (ПЦР-смесь-1-FRT (SC))**. Для проведения амплификации рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок на 0,025 мл (CERNEID, США).

Выявление РНК *INFLUENZA VIRUS A*.

1. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой пробирок в прибор, необходимо осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу к прибору Smart Cycler II.

2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

3. В основном меню программы выбрать **Define Protocols**. В открывшемся окне выбрать в нижнем левом углу экрана кнопку **New Protocol**, дать название протоколу и задать программу амплификации:

Программа амплификации для прибора SmartCycler II (CERNEID, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Stage1 Hold	95	900 с	–	1
Stage2 Temperature Cycle	95	15 с	–	42
	54	25 с	FAM, Cy3	
	72	25 с	–	

Примечание – Чтобы задать измерение флуоресцентного сигнала, необходимо щелкнуть на ячейке **Optics** второго шага циклирования и выбрать **ON**.

4. В нижней части окна нажать кнопку **Save Protocol**.

5. Нажать кнопку **Create Run** в основном меню программы. В окне **Run Name** нужно ввести имя файла, в котором будут сохранены все данные эксперимента. В центральной части левой панели экрана нажать стрелку **Dye set** и в ниспадающем меню выбрать комбинацию красок **FCTC25**.

6. В центре экрана нажать кнопку **Add/Remove Sites** и в появившемся окне выбрать нужный протокол (программу) и ячейки, в которых будет проводиться анализ. Нажать кнопку **OK**.

7. В таблице в верхней половине окна перечислены установки анализа данного эксперимента. В этой таблице для каждого образца в столбце **Sample Type** по

умолчанию указан тип образца **UNKN** (неизвестный). В колонке **Sample ID** дается название каждому образцу.

8. Запустить выполнение программы эксперимента кнопкой **Start Run** в нижней части экрана.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации ВКО.

1. Выбрать в меню «**Analysis settings**». В столбце **Manual Tresh Fluor Units** задать уровень пороговой линии «20» для канала Cy3 и нажать кнопку «Update Analysis» в нижней части окна.
2. В таблице результатов (окно «**Results Table**») появятся значения *Ct* по каналу Cy3, которые должны быть не более 37 для исследуемых образцов и контролей.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A*.

1. Выбрать в меню **Analysis settings**. В столбце **Manual Tresh Fluor Units** задать уровень пороговой линии «30» для канала FAM и нажать кнопку **Update Analysis** в нижней части окна.
2. В таблице результатов (окно **Results Table**) появятся значения *Ct* по каналу FAM.
3. Образец считают положительным, если значение *Ct* на канале FAM менее или равно 39.
4. Образец считают отрицательным, если по каналу FAM для него значение *Ct* отсутствует, а по каналу Cy3 для него определено значение *Ct*, не превышающее 37.
5. Если значение *Ct* на канале FAM больше 39, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК, и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения *Ct* на канале FAM менее или равного 39. При получении отрицательного результата по каналу FAM образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.
6. Образцы, для которых отсутствует значение *Ct* как по каналу FAM, так и по каналу Cy3, или получено значение *Ct* по каналу Cy3 более 37 требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контрольного образца (на канале FAM) и для отрицательного контроля ПЦР (TE-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов

или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

2. Если значение порогового цикла для K+ по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СУБТИПА H5N1 INFLUENZA VIRUS A

1. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой пробирок в прибор, необходимо осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу к прибору Smart Cycler II.

2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
3. В основном меню программы выбрать **Define Protocols**. В открывшемся окне выбрать в нижнем левом углу экрана кнопку **New Protocol**, дать название протоколу и задать программу амплификации:

Программа амплификации для прибора SmartCycler II (CERBEID, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Stage1 Hold	95	900 с	–	1
Stage2 Temperature Cycle	95	15 с	–	42
	54	25 с	FAM, Cy3	
	72	25 с	–	

Примечание – Чтобы задать измерение флуоресцентного сигнала, необходимо щелкнуть на ячейке **Optics** второго шага циклирования и выбрать **ON**.

4. В нижней части окна нажать кнопку **Save Protocol**.
5. Нажать кнопку **Create Run** в основном меню программы. В окне **Run Name** нужно ввести имя файла, в котором будут сохранены все данные эксперимента. В центральной части левой панели экрана нажать стрелку **Dye set** и в выпадающем меню выбрать комбинацию красок **FCTC25**.
6. В центре экрана нажать кнопку **Add/Remove Sites** и в появившемся окне выбрать нужный протокол (программу) и ячейки, в которых будет проводиться анализ. Нажать кнопку **OK**.
7. В таблице в верхней половине окна перечислены установки анализа данного эксперимента. В этой таблице для каждого образца в столбце **Sample Type** по умолчанию указан тип образца **UNKN** (неизвестный). В колонке **Sample ID** дается название каждому образцу.

8. Запустить выполнение программы эксперимента кнопкой **Start Run** в нижней части экрана.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A N1*.

1. Выбрать в меню **Analysis settings**. В столбце **Manual Tresh Fluor Units** задать уровень пороговой линии «60» для канала Cy3 и нажать кнопку **Update Analysis** в нижней части окна.
2. В таблице результатов (окно **Results Table**) появятся значения *Ct* по каналу Cy3.
3. Образец считают положительным, если значение *Ct* на канале Cy3 менее или равно 39.
4. Образец считают отрицательным, если значение *Ct* на канале Cy3 отсутствует. Если значение *Ct* на канале Cy3 больше 39, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения *Ct* на канале Cy3 менее или равного 39. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Анализ результатов амплификации кДНК *Influenza virus A H5*.

1. Выбрать в меню **Analysis settings**. В столбце **Manual Tresh Fluor Units** задать уровень пороговой линии «30» для канала FAM и нажать кнопку **Update Analysis** в нижней части окна.
2. В таблице результатов (окно **Results Table**) появятся значения *Ct* по каналу FAM.
3. Образец считают положительным, если значение *Ct* на канале FAM менее или равно 39.
4. Образец считают отрицательным, если значение *Ct* на канале FAM отсутствует. Если значение *Ct* на канале FAM больше 39, требуется повторить ПЦР, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения *Ct* на канале FAM менее или равного 39. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Одновременное выявление в пробе положительных сигналов по каналам FAM и Cy3 указывает на наличие в образце ***Influenza virus A H5N1*** или одновременное наличие в ней нескольких субтипов вируса гриппа, имеющих в своем составе гемагглютинин 5 и нейраминидазу 1 типа.

Возможные ошибки

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контрольного образца (на любом из каналов) и для отрицательного контроля ПЦР (TE-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение порогового цикла для K+ по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ 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).

ВНИМАНИЕ! Не допускается одновременная постановка с другими тестами из линейки Influenza.

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу RealTime_PCR v.7.3, 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**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный
 - **Метод** – Пороговый (Ct)
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец**
 - **Контроли** – нет
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл
 - **Флуорофоры** – Fam – специфика; Hex – ВКО.

Примечание – Для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Influenza virus A H5N1* и ПЦР-смеси-1-FRT (SC) *Influenza virus A H5N1* задать флуорофоры – **Fam** – специфика, **Hex** – 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 для прибора «ДТ-96»
(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)**

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин (при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT) 15 мин при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	Fam, Hex	
	72	25 с	–	

4. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне **Свободное заполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
6. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
7. 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 микропробирок 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.



8. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Обработка данных

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 *C_t* в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.

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 – 90 %.**
 - **Величина Threshold – 10-20 StD на участке линейного фитирования.**
 - **Критерии достоверности результата:** поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 5 %, 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 **Φ** (отжать кнопку).
6. Поочередно для каналов Fam и Hcx установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на уровне 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. **ВНИМАНИЕ!** Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной смеси.
7. 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 В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (см. табл. 1 и 2). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных в табл. 1 и 2 для прибора «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Таблица 1

Результаты анализа контрольных образцов при амплификации с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT и ПЦР-смесью-1-FRT (SC) *Influenza virus A* для прибора «ДТ-96»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу	
		Fam	Hex
		Детекция возбудителя	Детекция ВКО
ОК	Экстракция РНК	<u>отсутствует</u>	< 28
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К+	ПЦР	< 29	<u>отсутствует</u>

Таблица 2

Результаты анализа контрольных образцов при амплификации с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT и ПЦР-смесью-1-FRT (SC) *Influenza virus A H5N1* для прибора «ДТ-96»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу	
		Fam	Hex
		Детекция Гена-мишени (H5)	Детекция Гена-мишени (N1)
ОК	Экстракция РНК	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К+ _{5 тип}	ПЦР	< 27	<u>отсутствует</u>
К+ _{N1 тип}	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 27

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ.

1. **В образце обнаружен грипп А**, если в таблице результатов по каналу **Fam** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 3).
2. **В образце не обнаружен грипп А**, если в таблице результатов по каналу **Fam** для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу **Hex** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 3).
3. Если для исследуемого образца при амплификации с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A* (или ПЦР-смесь-1-FRT (SC) *Influenza virus A*) значение *Ct* по каналу **Fam** отсутствует, а значение *Ct* по каналу **Hex** **отсутствует или превышает пороговое** (см. табл. 3), **такой образец считается невалидным**. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции РНК/ДНК.
4. В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа А/Н5, если имеется значение *Ct* по каналу **Fam**, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 4).

5. В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1, если имеется значение *Ct* по каналу Hex, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 4).
6. Одновременное выявление в пробе положительных сигналов по каналам Fam и Hex указывает на наличие в образце *Influenza virus A H5N1* или одновременное наличие в ней нескольких субтипов вируса гриппа, имеющих в своем составе гемагглютинин 5 и нейраминидазу 1 типа.
7. **Образец считается сомнительным** по наличию возбудителя или данного гена-мишени, если в таблице результатов по каналу детекции возбудителя или гена-мишени для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 3 и 4). Образцы, для которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными по данному гену-мишени. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Таблица 3

**Интерпретация результатов в исследуемых образцах для прибора «ДТ-96»
(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)**

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу	
	Fam	Hex
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i>	< 33	< 31
ПЦР-смесь-1-FRT (SC) <i>Influenza virus A</i>	< 33	< 31

Таблица 4

**Интерпретация результатов в исследуемых образцах для прибора «ДТ-96»
(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)**

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу	
	Fam	Hex
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus H5N1</i>	< 33	< 33
ПЦР-смесь-1-FRT (SC) <i>Influenza virus H5N1</i>	< 33	< 33

Возможные ошибки

1. Если для K+ значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
2. Если для ОК и/или K- сигнал по каналу детекции возбудителя меньше граничного значения положительного результата, необходимо повторить исследование для

всех образцов, в которых обнаружена РНК/ДНК данного возбудителя, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (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 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...**). Нажать **OK**.
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Программа амплификации для прибора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-50 F)	–	1
2	95	10 с	–	10
	54	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	FAM, HEX	
	72	25 с	–	

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

3. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
4. 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** флуорофоры: FAM, HEX и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. 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.

5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
6. 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**.

Использование готового шаблона для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

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 C_t в соответствующей графе

таблицы результатов.

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 планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия 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 поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (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. Для всех каналов FAM, HEX пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Чтобы выделить график образца ПКО установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

3. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов.
4. Для дальнейшей работы с данными можно скопировать результаты значений C_t для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета о постановке в формате **.pdf** необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации РНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 5 и 6).

Таблица 5

Результаты анализа контрольных образцов при амплификации с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT** и **ПЦР-смесью-1-FRT (SC) Influenza virus A** для прибора CFX96

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу	
		Fam	Hex
		Детекция возбудителя	Детекция ВКО
ОК	Экстракция РНК	<u>отсутствует</u>	< 28
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К+	ПЦР	< 29	<u>отсутствует</u>

Таблица 6

Результаты анализа контрольных образцов при амплификации с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT** и **ПЦР-смесью-1-FRT (SC) Influenza virus A H5N1** для прибора CFX96

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу	
		Fam	Hex
		Детекция Гена-мишени (H5)	Детекция Гена-мишени (N1)
ОК	Экстракция РНК	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К ⁺ _{5 тип}	ПЦР	< 27	<u>отсутствует</u>
К ⁺ _{N1 тип}	ПЦР	<u>отсутствует</u>	< 27

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ.

1. **В образце обнаружен грипп А**, если в таблице результатов по каналу **FAM** для него определено значение порогового цикла *C_t*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 7).
2. **В образце не обнаружен грипп А**, если в таблице результатов по каналу **FAM** для него не определено значение порогового цикла *C_t* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу **HEX** для него определено значение порогового цикла *C_t*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 7).
3. Если для исследуемого образца при амплификации с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A* (или ПЦР-смесь-1-FRT (SC) *Influenza virus A*) значение *C_t* по каналу **FAM** отсутствует, а значение *C_t* по каналу **HEX** **отсутствует или превышает пороговое** (см. табл. 7), **такой образец считается невалидным**. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции РНК/ДНК.
4. В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа А/Н5, если имеется значение *C_t* по каналу FAM, не превышающее указанное (граничное) значение

- (см. табл. 8).
5. В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1, если имеется значение C_t по каналу HEX, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 8).
 6. Если в исследуемом образце отсутствуют значения C_t по обоим или одному из каналов (FAM, HEX) (см. табл. 8), а значение C_t по ВКО не превышает порогового значения для детекции ВКО (канал HEX) (см. табл. 7), следует считать, что в этом образце данный субтип H5N1 вируса гриппа А не идентифицирован (не обнаружен).
 7. Одновременное выявление в пробе положительных сигналов по каналам FAM и HEX указывает на наличие в образце *Influenza virus A H5N1* или одновременное наличие в ней нескольких субтипов вируса гриппа, имеющих в своем составе гемагглютинин 5 и нейраминидазу 1 типа
 8. **Образец считается сомнительным** по наличию возбудителя или данного гена-мишени, если в таблице результатов по каналу детекции возбудителя или гена-мишени для него определено значение порогового цикла C_t , превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 7 и 8). Образцы, для которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными по данному гену-мишени. При получении отрицательного результата образец считать сомнительным по наличию данного гена-мишени.

Таблица 7

**Интерпретация результатов в исследуемых образцах
для прибора CFX96 (Bio-Rad, США)**

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу	
	FAM	HEX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i>	< 33	< 31
ПЦР-смесь-1-FRT (SC) <i>Influenza virus A</i>	< 33	< 31

Таблица 8

**Интерпретация результатов в исследуемых образцах
для прибора CFX96 (Bio-Rad, США)**

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу	
	FAM	HEX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus H5N1</i>	< 33	< 33
ПЦР-смесь-1-FRT (SC) <i>Influenza virus H5N1</i>	< 33	< 33

Возможные ошибки.

1. Если для K+ значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
2. Если для ОК и/или K- сигнал по каналу детекции возбудителя меньше граничного значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК/ДНК данного возбудителя, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.