

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия  
человека (ФБУН ЦНИИ  
Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.Г. Акимкин  
«29» мая 2019 г.



## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации РНК вируса денге  
(*Dengue virus*, DV) 1-4 типов в биологическом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *Dengue virus* type-FL»**

**Формат FRT**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) .....	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США) .....	13
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ .....	16

## НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

### Соответствие мишеней и каналов детекции

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











### Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов <sup>1</sup>
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red
канал для флуорофора Cy5.5	Cy5.5/Crimson/Quasar705









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











## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ













**ВНИМАНИЕ!** В соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008 и ГОСТ 31340-2013 следующие реагенты подлежат маркировке как содержащие опасные вещества:

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м3	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	   Опасно (Danger)	   Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
			Гуанидин тиоцианат	Нет данных			
			Тригон X-100	Нет данных			
			1-Тиоглицерол	Нет данных			
Раствор для лизиса	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Гуанидин тиоцианат	Нет данных			
			Тригон X-100	Нет данных			
			1-Тиоглицерол	Нет данных			

<sup>2</sup> Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (EC) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>				
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м3	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны	
Раствор для отмывки 3	  Предупреждение (Warning)	  Предупреждение (Warning)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется	
Раствор для отмывки 4 *спирт*	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется	

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (EC) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>				
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м3	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны	
Раствор для отмывки 5	   <p>Опасно (Danger)</p>	   <p>Опасно (Danger)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется	
			Гуанидин тиоцианат	Нет данных				
Раствор для отмывки 6	  <p>Предупреждение (Warning)</p>	  <p>Предупреждение (Warning)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется	

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (EC) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>				
			Наименования опасных компонентов	ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м <sup>3</sup>	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмывки 7	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Ацетон	800/200	Пары	Класс опасности 4	Не требуется
Раствор для преципитации	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Раствор для отмывки 7	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

Примечание

ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT DV, ОКО	Концентрация опасного вещества (натрия азид) не более 0,1% - данные реагенты не классифицируются как опасные, не подлежат маркировке опасности и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности. При работе с данными реагентами необходимо соблюдать меры предосторожности, указанные в инструкции по применению	Натрия азид	Нет данных
----------------------------	---	-------------	------------

**ВНИМАНИЕ!** При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91.



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

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США) или пробирок для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) (детекция через дно пробирки).

### **Программирование амплификатора**

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

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

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



**Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл.** Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска.** Нажать кнопку **Next/Далее.**

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

**Программа амплификации для приборов роторного типа**

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

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

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

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

### **Анализ результатов**

Результаты анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

### **Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green:**

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррек. уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным 10 %.
6. Исключить циклы / **Eliminate Cycles before – 5**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

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

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

<b>Cy5/Red</b>	0,03	15%	включена	5
<b>Cy5.5/Crimson</b>	0,03	5%	включена	5

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

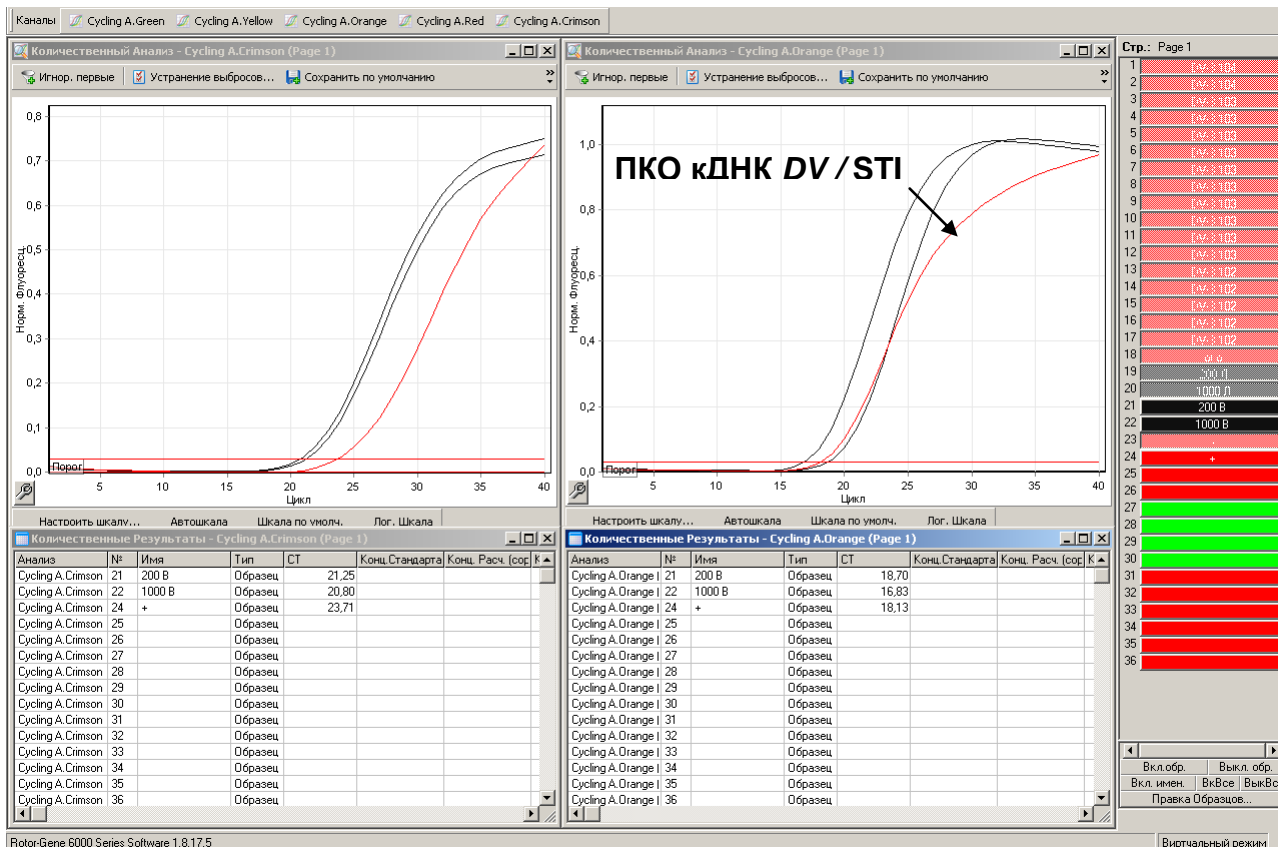
В том случае, если кривые флуоресценции по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold/Порог Фона - ПФ) равным 15-20 %.

### **Интерпретация результатов**

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

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

### Пример амплификации на приборе Rotor-Gene 6000



Пробы 200В и 1000В содержат РНК DV-III

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

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

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

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

### Программа амплификации для приборов планшетного типа

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

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

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

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

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

### **Анализ результатов**

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

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

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

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

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

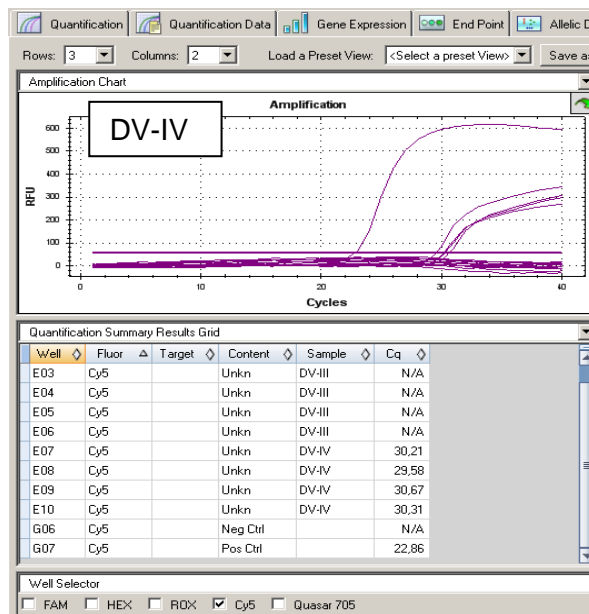
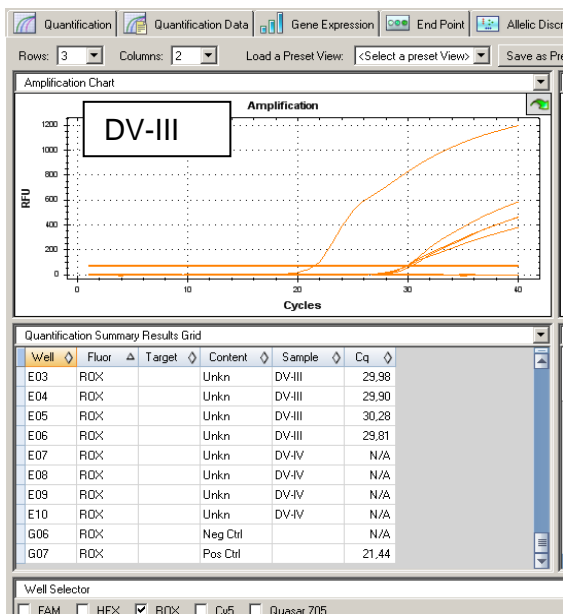
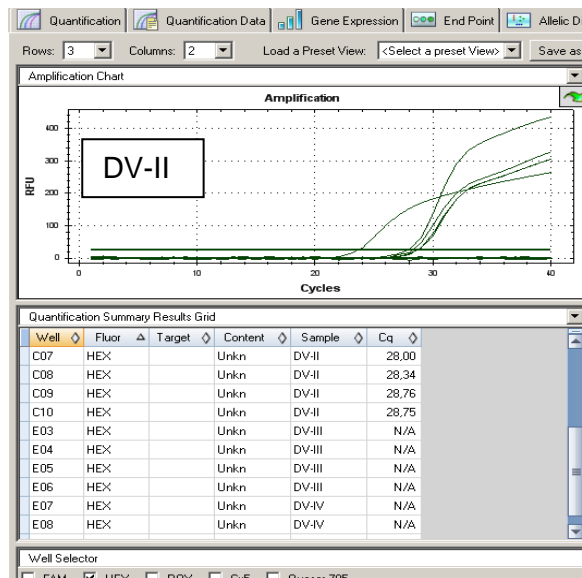
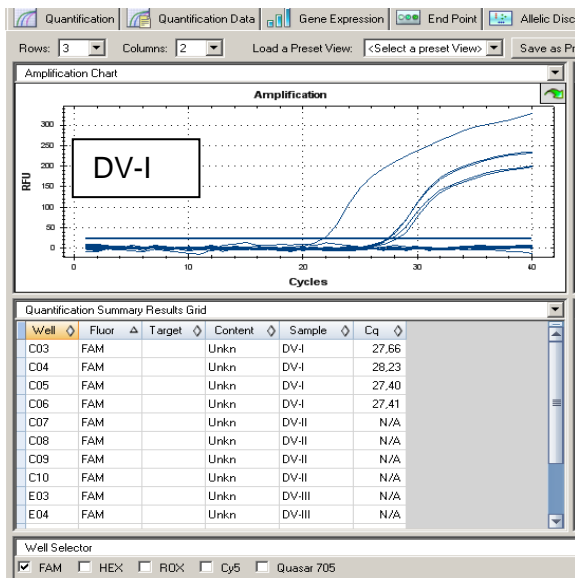
3. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.

## Интерпретация результатов

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

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

## Пример амплификации на приборе CFX96





## ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

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