

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для определения ДНК *Listeria monocytogenes*

в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс[®] *Listeria monocytogenes*-
скрин/монитор-FL»**

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) | 5 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай) | 10 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) | 11 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) | 15 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) | 19 |

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для определения ДНК *Listeria monocytogenes* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

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

Комплекты реагентов, рекомендованные для экстракции ДНК

Для экстракции ДНК из исследуемого материала с целью дальнейшего ПЦР-исследования с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора рекомендует следующие комплекты реагентов:

- «**РИБО-преп**» для экстракции ДНК/РНК из цельной крови, цельной пуповинной крови, спинномозговой жидкости (ликвора), пунктатов лимфатических узлов, мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, амниотической жидкости (околоплодных вод), мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, мочи, грудного молока, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания, объектов окружающей среды (концентратов образцов воды) в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов;
- «**ДНК-сорб-С**» для экстракции ДНК из плаценты и аутопсийного материала в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов.

Соответствие мишеней и каналов детекции

| Канал для флуорофора | FAM | JOE | ROX |
|----------------------|-------------------|--------------------------------------|--|
| ДНК-мишень | ДНК ВКО STI-87 | ДНК <i>L. monocytogenes</i> | ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob) |
| Область амплификации | STI-87 | Ген листерио-лизина O (<i>hly</i>) | β-глобиновый ген |

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

| Канал для флуорофора | Название канала детекции для разных моделей приборов ¹ |
|--------------------------|---|
| канал для флуорофора FAM | FAM/Green |
| канал для флуорофора JOE | JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3 |
| канал для флуорофора ROX | ROX/Orange/TxR |

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

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

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, 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).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Установить пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene 3000/6000/Q (ячейки карусели пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе). Запрограммировать прибор.

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).

Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
2. Во вкладке выбрать шаблон **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл** для редактирования и 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 поставить галочку

напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25** мкл. Установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. 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 (см. табл. 1).

Таблица 1

**Единая программа амплификации
и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»**

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество повторов |
|------|-----------------|--------|---|---------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | - | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | - | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | - | 45 |
| | 60 | 20 с | FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange | |

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

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

6. Задать параметры калибрования (активировать **Calibrate/Gain Optimisation.../Опм.уровня сигн.** в мастере нового эксперимента):
 - осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange (активировать **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опм. Детек-МЫХ**);
 - осуществлять калибрование по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange перед первым измерением (активировать **Perform Calibration Before 1st Acquisition/ Perform Optimisation Before 1st Acquisition/ Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - установить калибровки канала FAM/Green от **5FI** до **10FI**, канала JOE/Yellow – от **5FI** до **10FI**, канала ROX/Orange – от **5FI** до **10FI**, нажав кнопку **Edit.../Правка...** в окне **Auto gain calibration channel settings/Автом.**

оптимизация уровня сигнала.

7. Нажать кнопку **Next/Далее**. Для сохранения запрограммированного шаблона, необходимо, нажав кнопку **Save Template/Сохр.шаблон**, задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации - «АмплиСенс *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL». Сохранить файл в предлагаемую папку: **Templates\Quick Start Templates**; закрыть окно **New Run Wizard/Мастер Нового Теста**. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне **New Run/Новый тест**.

Использование готового шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**, затем в списке шаблонов выбрать шаблон «АмплиСенс *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL», запрограммированный согласно описанию в разделе **Создание шаблона**.
2. 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 поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**
3. В открывшемся окне, проверить, что указан объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, равный **25 мкл**, и напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска** установлена галочка, активирующая эту опцию. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий авто-оптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. При этом ротор с образцами должен быть уже закреплен и крышка прибора закрыта. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
5. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «K-», положительный – «K+». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип

Negative control/Отрицательный контроль. В случае проведения количественного теста для калибраторов установить тип **Standard/Стандарт** и указать их концентрации в столбце **Given Conc.** (значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше к набору реагентов). Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

Примечание – Для редактирования таблицы образцов до старта нужно, чтобы предварительно в меню **File/Файл** подменю **User preferences/Предпочтения** был выбран пункт **Edit Samples Before Run Started/Редактировать образцы перед стартом теста**.

Анализ результатов

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

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. 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**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,03**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.

7. В таблице результатов (окно **Quantitation Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct** и значения концентрации ДНК (**Calc Conc (copies/reaction)**).

Анализ результатов по каналам JOE/Yellow и ROX/Orange 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 |
|------------|-----------------|---|------------------------------------|
| FAM/Green | 0,03 | 10% | включена |
| JOE/Yellow | 0,03 | 10% | включена |
| ROX/Orange | 0,03 | 10% | включена |

ВНИМАНИЕ! В случае, если кривые флуоресценции по каналу JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту, допускается увеличение значения порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона – ПФ**) до **20%**.

Интерпретация результатов

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

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

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

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

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

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

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

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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


2. Открыть программу iCycler iQ5.

3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

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

Создание шаблона для проведения теста

1. Задать схему планшета (расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала в исследуемых образцах):

- в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**;
- в открывшемся окне нажать кнопку **Whole Plate loading** и задать схему планшета, используя кнопки верхней панели. Указать имя проб в столбце **Identifier/Condition** в появившейся строке в нижней части экрана. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам FAM, HEX, ROX. Нажать кнопку **Select/Add Fluorophores** и в открывшемся окне выбрать флуорофор, отметив его в графе **Selected** галочкой. Нажать **OK**. В окне **Fluorophore** появится название канала. Чтобы добавить измерение флуоресцентного сигнала к каждой пробе, необходимо нажать на флуорофор, чтобы он был активен и, используя кнопку **Fluorophore loading in whole Plate mode**  над схемой, выделить пробы на планшете;

- задать объем реакции (**Sample Volume**) **25** мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**) - **Tubes**;
 - сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.
2. Все биологические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-».
- Калибраторы **K1** и **K2** по исследуемым каналам задать как **Std (Standart)**, в колонке **Quantity** ввести значения, указанные во вкладыше к данной серии набора реагентов.
3. Задать программу амплификации. Для этого в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Таблица 2

**Единая программа амплификации
и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»**

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество повторов |
|------|-----------------|--------|---|---------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | - | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | - | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | - | 45 |
| | 60 | 20 с | FAM, JOE/HEX, ROX | |

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °С – 15 минут) для экономии времени. Примечание – Канал для флуорофора **Sy5** включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

4. Перед запуском выполнения программы необходимо проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Для измерения факторов лунок вариант **Use Persistent Well Factors** (предлагается по умолчанию). Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать ОК.
5. После окончания программы необходимо закрыть программу и выключить прибор (амплификатор и блок оптической системы).

Использование готового шаблонного файла 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 модуле в **Workshop** выбрать в верхнем левом окне необходимый файл постановки,
- в блоке **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и отредактировать схему планшета (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **SampleFiles**);
- в блоке **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и проверить правильность выбранного протокола (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора iCycler iQ5. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *L. monocytogenes*.

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. Выбрать режим анализа данных **Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (установлен по умолчанию).
3. Просматривать данные отдельно по каждому каналу.
4. Установить пороговую линию поочередно для каждого из канала на определенном уровне в соответствии с табл. 3. Для этого нужно нажать кнопку **Log View** (переключение в логарифмический вид). Величина уровня пороговой линии устанавливается как **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции положительного контроля экстракции (ПК) в последнем цикле амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале. При этом кривая флуоресценции положительного контроля экстракции (ПК) должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема

флуоресценции, переходящего в линейный подъем. Для установки пороговой линии на определенном уровне необходимо перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши.

Таблица 3

| <i>Канал</i> | <i>Уровень пороговой линии, % от максимально уровня флуоресценции образца ПК</i> |
|----------------|--|
| FAM | 10 - 20 |
| JOE/HEX | 10 - 20 |
| ROX | 10 - 20 |

5. В таблице результатов (окно **Quant. Results**) появятся значения *Ct* для анализируемого канала.
6. Для анализа результатов нажать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

Интерпретация результатов

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

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, 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 (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала):

Таблица 4

**Единая программа амплификации
и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»**

| Цикл | Температура, °C | Время | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество повторов |
|------|-----------------|--------|---|---------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | - | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | - | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | - | 45 |
| | 60 | 20 с | FAM, HEX, ROX | |

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

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

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

| | | |
|---|--------|------------------------------------|
| 1 | 50,0 | C for 15:00 |
| 2 | 95,0 | C for 15:00 |
| 3 | 95,0 | C for 0:10 |
| | | Slow Ramp Rate to 2,5 C per second |
| 4 | 60,0 | C for 0:20 |
| | | + Plate Read |
| | | Slow Ramp Rate to 2,5 C per second |
| 5 | GOTO 3 | .44 more times |
| | | END |

3. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.
4. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New** и ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
5. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками в колонке **Selected** все флуорофоры **FAM, HEX, ROX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов, кроме ДНК-калибраторов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
Для ДНК-калибраторов **K1 LIM** и **K2 LIM** для всех каналов обозначить **Sample type – Standard** и указать их концентрацию в поле **Concentration** в соответствии с вкладышем к набору реагентов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
6. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New** и ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
7. 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.

8. 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 *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *L.monocytogenes*.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Установить пороговую линию поочередно для каждого из канала на определенном уровне в соответствии с табл. 5. Для этого нужно нажать кнопку **Log Scale** (переключение в логарифмический вид). Величина уровня пороговой линии устанавливается как **10-20** % от максимального уровня флуоресценции положительного контроля экстракции (ПК) в последнем цикле амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале. При этом кривая флуоресценции положительного контроля экстракции (ПК) должна пересекать

пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем. Для установки пороговой линии на определенном уровне необходимо перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши.

Таблица 5

| Канал | Уровень пороговой линии, % от максимально уровня флуоресценции образца ПК |
|--------------|--|
| FAM | 10 - 20 |
| HEX | 10 - 20 |
| ROX | 10 - 20 |

4. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов и концентрации калибраторов.
5. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

Интерпретация результатов

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «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, 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).

Программирование амплификатора

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

Создание шаблона для проведения теста

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

**Единая программа амплификации и
детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»**

| Цикл | Температура, °С | Время | Измерение флуоресценции | Количество циклов |
|-------------|------------------------|--------------|--------------------------------|--------------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | – | 45 |
| | 60 | 20 с | Fam, Hex/R6G, Rox | |

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Примечание – Каналы **Су5** и **Су5.5** включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**АмплиСенс**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

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

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

Использование готового шаблонного файла для проведения теста


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

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

Анализ результатов

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

Открыть сохраненный файл с данными анализа.

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

Нажать кнопку **Применить**.

4. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки Ф (отжать кнопку).**
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Интерпретация результатов

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

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