

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов  
для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila  
pneumoniae* в биологическом материале методом  
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-  
флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* /  
*Chlamydophila pneumoniae*-FL»**

**Формат FRT**

**АмплиСенс®**



Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Центральный научно-исследовательский  
институт эпидемиологии»,  
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) .....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай) .....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).....	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).	21

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **«АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL»** формат FRT 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);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

### 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/Fam
Канал для флуорофора JOE	JOE/Yellow/HEX/Hex
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/Rox

.

<sup>1</sup> 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 или выше, 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.

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.
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/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
5. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор**, и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками

(Rotor-Gene 3000) / закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.

6. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Для прибора Rotor-Gene 6000 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 параметры амплификации (см.табл. 1):

Таблица 1

Программа амплификации для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	<b>5 мин</b> (для варианта FRT) <b>или</b> <b>15 мин</b> (для варианта FRT-100 F)	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	20 с	–	
	72	10 с	–	
3	95	10 с	–	35
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 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..**
  - осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
  - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
  - установка калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

11. Дать название эксперимента 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 клинических и контрольных образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «K–», положительный – «K+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **Negative control/Отрицательный контроль**. 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 (ДНК *Mycoplasma pneumoniae*)

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**) должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,05**.
5. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **20 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

**Анализ результатов реакции амплификации по каналу JOE/Yellow (ДНК человека)**

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопку **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,1**;
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

**Анализ результатов реакции амплификации по каналу ROX/Orange (ДНК Chlamydophila pneumoniae)**

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,1**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным **5 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

**Интерпретация результатов в контрольных образцах**

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для 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.

### **Интерпретация результатов в исследуемых образцах**

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, если по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Chlamydomonas pneumoniae*, если по каналу ROX/Orange определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Если в исследуемом образце значение *Ct* отсутствует или превышает указанное во вкладыше граничное значение по одному из каналов (FAM/Green и ROX/Orange), а значение *Ct* по ВКО (ДНК человека - канал JOE/Yellow) не превышает граничное значение (см. вкладыш), следует считать, что в этом образце данный возбудитель не идентифицирован (не обнаружен).

Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналам детекции (FAM/Green или ROX/Orange) или превышает указанное граничное значение (см. вкладыш), и по каналу для ВКО (JOE/Yellow) значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК. При повторении результата рекомендовать повторный сбор материала для анализа.

### **Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:**

1. Образцы (кроме К– и В–), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К–» и «В–» отрицательный результат по всем каналам является нормой.



2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по любому из каналов отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для положительного контроля ПЦР (К+) и всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу детекции гена-мишени меньше граничного значения положительного результата необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен данный возбудитель, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

**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 ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

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

### Программирование амплификатора:

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

1. Включить прибор и запустить программу **«ДТ-96 v.7.3»**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
3. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
4. 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 – эндогенный ВКО; Rox – специфика.
5. Задать программу амплификации с применением команды **Создать новую программу/редактировать программу** (см.табл. 2)

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F)	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	60	25 с	Fam, Hex, Rox	
	72	25 с	–	

- Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать соответствующее название теста, указать количество образцов и нажать **ОК**.
- Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне **Свободное заполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
- Указать **Объем рабочей смеси** – 25 мкл – и нажать кнопку **Запуск программы**.
- Выбрать закладку **Запуск программы амплификации**, проверить параметры теста. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

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

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

### Анализ результатов

- Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
- Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct (Cp)** для всех каналов.
- Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый Ct**.
- Отключить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Φ** (отжать кнопку).
- Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. В открывшейся вкладке установить **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %, Критерии**

**достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 5 %, верхняя граница/порог нормализации данных – 10 %.**

Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку **Применить**.

6. Поочередно для каналов Fam, Hex и Rox установить уровень пороговой линии (левой кнопкой 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.

Нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат **\*MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML**, выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

#### **Интерпретация результатов в контрольных образцах**

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 для прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).

#### **Интерпретация результатов в исследуемых образцах**

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, если по каналу Fam определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Chlamydomonas pneumoniae*, если по каналу Rox определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Если в исследуемом образце значение *Ct* отсутствует или превышает указанное во вкладыше граничное значение по одному из каналов (Fam и Rox), а значение *Ct*

по ВКО (ДНК человека - канал Нех) не превышает граничное значение (см. вкладыш), следует считать, что в этом образце данный возбудитель не идентифицирован (не обнаружен).

Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла  $C_t$  по каналам детекции (Fam или Rox) или превышает указанное граничное значение (см. вкладыш), и по каналу для ВКО (Нех) значение  $C_t$  также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК. При повторении результата рекомендовать повторный сбор материала для анализа.

**Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:**

1. Образцы (кроме К– и В–), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К–» и «В» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по любому из каналов отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для положительного контроля ПЦР (К+) и всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) сигнал по каналу детекции гена-мишени меньше граничного значения положительного результата необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен данный возбудитель, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

## 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 (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 осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:**

### Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Открыть программу iCycler или iQ5 в зависимости от используемого прибора.
3. Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE и ROX**.
  - 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, JOE-530 и ROX-575**. 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 использованную ранее схему планшета, 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 (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	<b>5 мин</b> (для варианта FRT) <b>или</b> <b>15 мин</b> (для варианта FRT-100 F)	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	60	25 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	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 модели **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 реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета и запустить выполнение выбранной программы 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**.

6. После окончания программы приступить к анализу результатов.

### **Анализ результатов**

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла  $C_t$  в соответствующей графе в таблице результатов.

Для всех каналов FAM, JOE/HEX и ROX 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. 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, для приборов **iCycler iQ** или **iQ5 (Bio-Rad, США)**.

### **Анализ результатов амплификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae***

1. 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 **FAM**. 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**.

2. 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**.

#### **Анализ результатов амплификации ДНК человека (ВКО)**

1. Для прибора iCycler iQ5 выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**. 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**.
2. Для прибора iCycler iQ в модуле **Lybrary** 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 ДНК *Chlamydomophila pneumoniae***

- Для прибора iCycler iQ5 выбрать в окне модуля данные по каналу **ROX**, отключив кнопки **FAM** и **JOE**. 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 **ROX-575**. 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 в исследуемых образцах**

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, если по каналу FAM определено значение порогового цикла **Ct**, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Chlamydomonas pneumoniae*, если по каналу ROX определено значение порогового цикла **Ct**, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Если в исследуемом образце значение **Ct** отсутствует или превышает указанное во вкладыше граничное значение по одному из каналов (FAM и ROX), а значение **Ct** по ВКО (ДНК человека - канал JOE/HEX) не превышает граничное значение (см. вкладыш), следует считать, что в этом образце данный возбудитель не идентифицирован (не обнаружен).

Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла **Ct** по каналам детекции (FAM или ROX) или превышает указанное граничное значение (см. вкладыш), и по каналу для ВКО (JOE/HEX) значение **Ct** также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК. При повторении результата рекомендовать повторный сбор материала для анализа.

### **Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:**

1. Образцы (кроме К– и В–), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке

рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца К– и В– отрицательный результат по всем каналам является нормой.

2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по любому из каналов отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для положительного контроля ПЦР (К+) и всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) сигнал по каналу детекции гена-мишени меньше граничного значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен данный возбудитель, 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:

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**) .
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor - New** задать параметры амплификации (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала – см. табл. 4). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Таблица 4

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	<b>5 мин</b> (для варианта FRT) <b>или</b> <b>15 мин</b> (для варианта FRT-100 F)	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	60	25 с	FAM, HEX, ROX	
	72	25 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....**

Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.

5. 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, используемые в данной постановке и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, подтверждая название каждого образца кнопкой **Load**.
6. 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.
7. 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.
8. 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  $C_t$  в соответствующей графе в таблице результатов).

Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.

Для всех каналов FAM, HEX и ROX 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.

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 для прибора **CFX96 (Bio-Rad, США)**.

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

### **Интерпретация результатов в исследуемых образцах**

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, если по каналу FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

В исследуемом образце идентифицирована ДНК *Chlamydomonas pneumoniae*, если по каналу ROX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Если в исследуемом образце значение *Ct* отсутствует или превышает указанное во вкладыше граничное значение по одному из каналов (FAM и ROX), а значение *Ct* по ВКО (ДНК человека – канал HEX) не превышает граничное значение (см. вкладыш), следует считать, что в этом образце данный возбудитель не идентифицирован (не обнаружен).

Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналам детекции (FAM или ROX) или превышает указанное граничное значение (см. вкладыш), и по каналу для ВКО (HEX) значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК. При повторении результата рекомендовать повторный сбор материала для анализа.

### **Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:**

1. Образцы (кроме К– и В–), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. При получении отрицательного результата при повторной постановке

рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца К– и В– отрицательный результат по всем каналам является нормой.

2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по любому из каналов отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для положительного контроля ПЦР (К+) и всех отрицательных клинических образцов.
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) сигнал по каналу детекции гена-мишени меньше граничного значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен данный возбудитель, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.