

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов  
для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в  
биологическом материале и объектах окружающей среды  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией  
**«АмплиСенс<sup>®</sup> *Legionella pneumophila*-FL»**  
**Вариант FRT**

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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).....	4
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА.....	6
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА .....	8

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» вариант FRT совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени» «Rotor-Gene» 3000 и «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research»).

### 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

<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)

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

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

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

### Программирование амплификатора:

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню **Advanced/Детальный мастер** и шаблон запуска эксперимента **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. Выбрать тип ротора **36-Well Rotor/36-луночный ротор**. Поставить отметку в окне рядом с надписью **No Domed 0,2ml Tubes/Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**.
4. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл**. Для прибора **Rotor-Gene 6000** должно быть активно (отмечено галочкой) окно **15  $\mu$ l oil layer volume/15  $\mu$ L объем масла/воска**. (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
6. Нажать кнопку **Next/Далее**.
7. В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
8. Задать следующие параметры эксперимента:

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	20 с	–	
	72	10 с	–	
3	95	10 с	–	35
	56	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

9. Нажать кнопку **OK/Да**.
10. В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сугн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых.** Для обоих красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение **5**, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение **10**. В графе **Tube position/Позиция Пробирки** указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр **gain/усиление сигнала**, по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции.** Закрыть окно **Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала**, нажав кнопку **Close/Заккрыть**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
11. Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
12. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна).

При проведении качественного анализа все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

**ВНИМАНИЕ!** При проведении количественного анализа концентрации калибраторов ДНК *Legionella pneumophila* и калибраторов ДНК ВКО-STI-338 вводятся отдельно. Для этого в окне редактирования образцов необходимо сформировать **2** страницы. Первая страница (**Page 1/Стр.1**) предназначена для ввода значений концентрации ДНК ВКО-STI-338. Вторая страница (**Page 2/Стр.2**)

предназначена для ввода значений концентрации ДНК *Legionella pneumophila*. На обеих страницах в колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов, контролей и калибраторов. В колонке **Type/Тип** обозначить типы образцов, для исследуемых образцов установить тип **Unknown/Образец**, для калибраторов установить тип **Standart/Стандарт**, выбрав формат данных (**Given Conc. Format/Формат Задан. Конц.**): «1,235E+5» и единицы измерения (**Unit/Единица**): «copies/ml». На первой странице (Page 1/Стр.1) в соответствующий столбец (**Given Conc./Задан. Конц.**) необходимо внести значения концентрации ДНК ВКО-STI-338 в образцах калибраторов LS1, LS2 и LS3, указанные во вкладыше к тест-системе. На второй странице (**Page 2/Стр.2**) в соответствующий столбец (**Given Conc./Задан. Конц.**) необходимо внести значения концентрации ДНК *Legionella pneumophila* в образцах калибраторов LS1, LS2 и LS3, указанные во вкладыше к набору реагентов.

## АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

### Анализ результатов амплификации ВКО

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, выбрать в меню **Cycling A. FAM/Cycling A. Green**, нажать кнопку **Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
4. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
5. В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) - 10%**.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

### Анализ результатов амплификации ДНК *Legionella pneumophila*

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа

**Quantitation/Количественный**, выбрать в меню **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow**, нажать кнопку **Show/Показать**.

- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) - 10%**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
- В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

#### Интерпретация результатов качественного анализа

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и выделения ДНК (см. табл. 1).

Таблица 1

#### Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение <i>Ct</i> по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
OK	Выделение ДНК	< 28	Нет значений
ПК	Выделение ДНК	< 28	<33
К-	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	<30	< 33

- Образец считают положительным**, если значение *Ct* на канале JOE/Yellow менее 33.
- Образец считают отрицательным**, если по каналу JOE/Yellow для него значение *Ct* отсутствует, а по каналу FAM/Green для него определено значение *Ct*, не превышающее 28 для образцов клинического материала и не превышающее 25 для образцов окружающей среды.

#### Результаты не подлежат интерпретации:

- Если значение *Ct* на канале JOE/Yellow больше 33, а значение *Ct* по каналу FAM/Green не превышает 28, требуется повторить ПЦР и считать его

положительным в случае повторения результата или получения значения *Ct* на канале JOE/Yellow менее 33.

2. Образцы, для которых отсутствует значение *Ct* как по каналу JOE/Yellow, так и по каналу FAM/Green, или получено значение *Ct* по каналу FAM/Green более 28 для клинического материала и 25 для образцов окружающей среды требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.
3. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контрольного образца (на канале JOE/Yellow) и для отрицательного контроля ПЦР (TE-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

## **АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА**

### **Анализ результатов амплификации ВКО**

1. Нажать в меню кнопку ***Analysis/Анализ***, выбрать режим анализа ***Quantitation/Количественный***, для канала ***Cycling A. FAM/Cycling A. Green*** отметить ***Page1/Стр.1*** и нажать кнопку ***Show/Показать***.
2. Отменить автоматический выбор ***Threshold/Порог***.
3. В меню основного окна ***Quantitation analysis/Количественный анализ*** должны быть активированы кнопки ***Dynamic tube/Динамич.фон*** и ***Slope Correct/Коррек. уклона***.
4. В меню окна ***More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов*** установить значение ***NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) - 10%***.
5. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку ***Linear scale/Линейная шкала***, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки ***Linear scale/Линейная шкала*** видна кнопка ***Log scale/Лог. Шкала***).
6. В меню ***CT Calculation/Вычисление СТ*** (в правой части окна) выставить ***Threshold/Порог = 0.05***.
7. В таблице результатов (окно ***Quant. Results/Количественные Результаты***) появятся значения ***Ct***.
8. Расчет количества копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл тестируемой пробы



проводится автоматически программой прибора по заданным значениям калибраторов, и полученное значение появляется в соответствующей графе в таблице результатов (**Calc conc/Конц. Рассч.**).

### **Анализ результатов амплификации ДНК *Legionella pneumophila***

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, для канала **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow** отметить **Page2/Стр.2** и нажать кнопку **Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
4. В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) - 10%**.
5. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Лог. Шкала**).
6. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
8. **Расчет количества копий ДНК *Legionella pneumophila* в 1 мл тестируемой пробы проводится автоматически программой прибора по заданным значениям калибраторов, и полученное значение появляется в соответствующей графе в таблице результатов (**Calc conc/Конц. Рассч.**).**

### **Интерпретация результатов количественного анализа**

Значение коэффициента  $R^2$  (коэффициента корреляции) должно быть не менее 0,97.

Показатель эффективности амплификации (**Efficiency**) должен находиться в пределах **0,8 – 1,15**.

Расчет концентрации ДНК *Legionella pneumophila* в 1 л воды (**C<sub>днк Lp</sub> (копий / л)**) проводят вручную или с использованием программного обеспечения, прилагающегося к комплекту реагентов, по следующей формуле:

$$C_{\text{днк } Lp} \text{ (копий / л)} = K_{\text{днк } Lp} / K_{\text{ВКО-STI-338}} * C_{\text{ВКО-STI-338}} * 2, \text{ где}$$

**K<sub>днк Lp</sub> (копий / мл)** = Расчетное количество копий ДНК *Legionella pneumophila* в 1 мл

тестируемой пробы,

$K_{\text{ВКО-STI-338}}$  (копий / мл) = Расчетное количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца в тестируемой пробе,

$C_{\text{ВКО-STI-338}}$  (копий / мл) = Количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца (значение указано во вкладыше к набору реагентов),

**2** – коэффициент пересчёта.

Расчетная концентрация контрольной пробы «ПК» *Legionella pneumophila* должна находиться в пределах заданного во вкладыше к набору реагентов диапазона.

**Результаты анализа не подлежат интерпретации если:**

1. В таблице результатов для отрицательного контроля выделения на канале JOE/Yellow и для отрицательного контроля ПЦР на любом из каналов появляется любое значение  $C_t$ , что свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Значение концентрации ДНК *Legionella pneumophila* в контрольном образце выделения ДНК (ПК) не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, значит, допущена ошибка либо на этапе выделения ДНК, либо на этапе проведения амплификации. Необходимо повторно провести ПЦР-анализ.
3. Количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл тестируемой пробы ниже среднего значения концентрации ДНК препарата ВКО-STI-338, указанного во вкладыше к набору реагентов, более чем в 5 раз. Это свидетельствует о низкой эффективности выделения ДНК из данного образца или о неэффективной очистке от ингибиторов – необходимо протестировать образец повторно, начиная с этапа выделения ДНК.