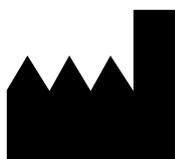


МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и
идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в
биологическом материале и объектах окружающей среды
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL»
Формат FRT

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)	4

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- RotorGene 3000, RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

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/R6GYellow/Cy3
канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR

Идентификация ДНК холерных вибрионов всех серогрупп возбудителя проводится по наличию последовательности Hly, идентификация патогенных штаммов *Vibrio cholerae* осуществляется по наличию основных факторов вирулентности – CtxA, tcpA, принадлежность к серогруппе O1 определяется по наличию амплификации мишени wbeT и принадлежность к серогруппе O139 определяется по наличию амплификации мишени wbfR. Постановка реакций осуществляется в формате «мультиплекс» в двух пробирках, содержащих ПЦР-смесь-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин и ПЦР-смесь-1-FRT *Vibrio cholerae* тип (табл. 1).

Таблица 1

Соответствие наименования ПЦР-смесей-1-FRT и каналов детекции при использовании набора реагентов «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL»

ПЦР-смесь-1-FRT	Детекция по каналу		
	FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> скрин	CtxA	BKO	tcpA
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> тип	wbeT	Hly	wbfR

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, с приборами 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 англоязычной версии программы 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. При использовании приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой. Поместить микропробирки в ячейки ротора прибора Rotor-Gene 3000/6000/Q начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе); установить ротор в прибор, закрыть крышку.

ВНИМАНИЕ! Если проводится одновременная постановка «Скрин» и «Тип», калибровку необходимо проводить по пробирке «К-» с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин, то есть поместить её в 1-ю позицию ротора.

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 окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml 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 отмечено окошко **15 µl oil layer volume/15 мкл объем масла/воска**. Если отметка не стоит по умолчанию, поставить галочку с помощью мышки.
6. Нажать кнопку **Next/Далее**.
7. В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.

8. Задать следующие параметры эксперимента:

1. Hold/Удерж. темп-ры 95 °С – 5 мин
2. Cycling/Циклирование 95 °С – 10 с
60 °С – 25 с
72 °С – 10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
3. Cycling2/Циклирование2 95 °С – 10 с
56 °С – 25 секунд – Детекция
72 °С – 10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.

Флуоресценцию измеряют при **56 °С** (во втором блоке циклирования) на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange**.

4. Нажать кнопку **ОК/Да**.

9. В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт. уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. детек-мых**. Поставить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для всех каналов детекции (**FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange**) необходимо 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 позиция в роторе, поэтому в 1-ой позиции в роторе должна находиться пробирка с реакционной смесью).

Закрывать окно **Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала**, нажав кнопку **Close/Закрывать**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

10. Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

11. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

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

После окончания выполнения программы амплификации приступить к анализу и интерпретации результатов.

Анализ результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси-1.

Анализ результатов амплификации с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин:

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. 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 **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 5%**.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
8. Выполнить такие же операции для каналов **JOE/Yellow** и **ROX/Orange**, используя те же параметры по пунктам 1-5.
9. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) для канала **JOE/Yellow** выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
10. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) для канала **ROX/Orange** выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.

Анализ результатов амплификации с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип:

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. 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 **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 5%**.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
8. Выполнить такие же операции для каналов **JOE/Yellow** и **ROX/Orange**, используя те же параметры по пунктам 1-5.
9. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) для канала **JOE/Yellow** выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
10. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) для канала **ROX/Orange** выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.1**.

Интерпретация результатов

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

Результат анализа считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 2 и 3).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла <i>Ct</i> по каналу для флуорофора		
		FAM/Green (Ct _x A)	JOE/Yellow (BKO)	ROX/Orange (tcpA)
OK	Экстракция ДНК	Нет значений	< граничного значения	Нет значений
K-	ПЦР	Нет значений	Нет значений	Нет значений
K ⁺ _{скрин}	ПЦР	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения
BK+	ПЦР	Нет значений	< граничного значения	Нет значений

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования
с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла <i>Ct</i> по каналу для флуорофора		
		FAM/Green (O1)	JOE/Yellow (<i>V.cholerae</i>)	ROX/Orange (O139)
OK	Выделение ДНК	Нет значений	Нет значений	Нет значений
K-	ПЦР	Нет значений	Нет значений	Нет значений
K+ _{тип}	ПЦР	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения

- Образец считается положительным** по искомой мишени, если в таблице результатов пороговых циклов по соответствующему каналу, например, FAM/Green (**Quant. Results – Cycling A. FAM/Green**), для него определено значение *Ct*, не превышающее граничного значения.
- Образец считается отрицательным** по искомой мишени, если в таблице пороговых циклов по соответствующему каналу для него не указывается значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию – **Threshold**).
- Образцы с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин для которых отсутствуют значения *Ct* по каналам FAM/Green и ROX/Orange, а также отсутствует значение *Ct* (или получено значение *Ct* более граничного значения) по каналу JOE/Yellow, требуют повторного проведения этапов экстракции ДНК и ПЦР.
- Результаты тестирования образцов, для которых получен положительный результат по любой мишени, кроме Hly (отрицательный результат по каналу JOE/Yellow с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип) и получено значение *Ct* менее граничного по каналу JOE/Yellow с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин, считать невалидными. Требуются повторные забор материала и исследование.
- Результаты тестирования образцов с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип, для которых отсутствует значение *Ct* по каналу JOE/Yellow, и выполняются условия пункта 3, считаются невалидными и требуют повторного проведения экстракции ДНК и ПЦР.

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

	ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> скрин			ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> тип		
Варианты	Значение порогового цикла по каналу					
	FAM/Green (CtхА)	JOE/Yellow (ВКО)	ROX/Orange (tcpA)	FAM/Green (O1)	JOE/Yellow (<i>V.cholerae</i>)	ROX/Orange (O139)
<i>V.cholerae</i> O1 токсигенный	< граничного значения	Любое значение или отсутствие	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 токсигенный	< граничного значения	Любое значение или отсутствие	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> O1 НЕ токсигенный, но содержащий последовательность tcpA	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 НЕ токсигенный, но содержащий последовательность tcpA	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> O1 НЕ токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 НЕ токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> НЕ O1 и НЕ O139	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	Нет значений
Холерные вибрионы НЕ обнаружены	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	Нет значений	Нет значений

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (на каналах FAM/Green и/или ROX/Orange – для ПЦР-смеси-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин и/или на любом из каналов – для ПЦР-смеси-1-FRT *Vibrio cholerae* тип) и для отрицательного контроля ПЦР (ДНК-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа положительных по данному каналу проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по данному каналу проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Отсутствие положительного сигнала в пробах с положительными контролями

ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР повторно для всех отрицательных проб.