

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения ДНК
метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного
Staphylococcus aureus, метициллин-резистентных
коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. в биологическом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] MRSA-скрин-титр-FL»

Формат FRT

АмплиСенс[®]



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG, (BioMerieux, Франция)	5
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ И iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	13

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
В–	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПКО	- положительный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. в биологическом материале (мазок из ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), мокрота, эндотрахеальный аспират, промывные воды бронхов, моча (осадок первой порции), кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость (СМЖ), пунктаты из очагов поражения органов и тканей, смывы с медицинского оборудования, инструментария и инвентаря) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] MRSA-скрин-титр-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),
 - iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- а также совместно с автоматической станцией NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) для проведения экстракции (выделения) РНК/ДНК.

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
канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red
канал для флуорофора Cy5.5	Cy5.5/Crimson/Quasar705

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

ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG, (BioMerieux, Франция)

Порядок работы

Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора.

Данный метод выделения позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для выделения ДНК (установить **Plasma**), объем образца (**volume**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) - **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Lysed**, очередность выделения ДНК в образцах (**priority**) - **normal**.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing – no, On-board Lysis Incubation – no**.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для выделения ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный и положительный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-87**. Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

ВНИМАНИЕ! При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объёмом 1,5 мл. После окончания инкубации (**пункт 8**) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для выделения ДНК в приборе NucliSENS easyMAG.

6. В пробирки с **буфером для лизиса NucliSens** и **ВКО STI-87**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) внести **100 мкл ОКО**. В

пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК MRSA**.

8. Инкубировать пробирки в течение 10 минут при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку с магнитной силикой **NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по **10 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения ДНК с лизисом образцов вне прибора (**off board**).
11. После окончания экстракции ДНК извлечь пробирки из прибора. Пробирки с ДНК-пробами перенести в зону ПЦР-амплификации.

Вариант 2. Выделение ДНК с лизисом образца в приборе.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для выделения ДНК - плазма (**Plasma**), объем образца (**volume**) – **0,1-1 ml**, объем элюции (**Eluate**) - **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность выделения ДНК в образцах (**priority**) - **normal**.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит автоматически в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing-Yes, On-board Lysis Incubation-Yes**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В каждую пробирку, предназначенную для выделения ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл** подготовленных проб отдельным наконечником с фильтром.
6. Для отрицательного контроля (В-) в пробирку, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК MRSA**.
7. В отдельной стерильной пробирке на 2 мл смешать **магнитную силику NucliSens** и **ВКО STI-87** стерильными наконечниками с фильтром в следующем соотношении:

Количество образцов для выделения ДНК	Количество магнитной силики NucliSens (мкл)	Количество ВКО STI-87 (мкл)
1	10	10
24 (полная загрузка прибора)	250 (с запасом на 25 проб)	250 (из двух пробирок)

8. Содержимое пробирки тщательно перемешать. Смесь магнитной силики NucliSens с ВКО STI-87 может храниться не более 30 мин.
9. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения ДНК с лизисом образцов в приборе (**on board**).
10. Дождаться, пока прибор NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State – Idle** (примерно 15 мин).
11. Тщательно перемешать пробирку с приготовленной смесью магнитной силики NucliSens, ВКО STI-87 на вортексе до однородного состояния.
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **20 мкл приготовленной смеси**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью многоканальной пипетки отдельными наконечниками с фильтром на 200 мкл.
12. Запустить на приборе программу продолжения экстракции (выделения) ДНК.
13. После окончания экстракции ДНК извлечь пробирки из прибора. Пробирки с ДНК-пробами перенести в зону ПЦР-амплификации.

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 RotorGene 3000 следует использовать программу RotorGene версии 6.1 и выше, с прибором RotorGene 6000 – программу RotorGene 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.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора RotorGene 3000, RotorGene 6000 и RotorGene Q рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки).

Поместить микропробирки в ячейки ротора амплификатора Rotor-Gene 3000/6000/Q так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе); установить ротор в прибор, закрыть крышку.

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

Программирование амплификатора:

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. 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 отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками / закреплено фиксирующее кольцо. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл**. Установить галочку напротив

функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

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

Программа амплификации «MRSA» для приборов роторного типа²

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	15 с	–	5
	60	30 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	15 с	–	40
	55	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

6. После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн..**
- а) осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
- б) для установки калибровки всех каналов нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал - 5, Max Reading/Максим. Сигнал - 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition** / «**Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
10. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», положительный – «К+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контроля ПЦР – тип **Positive**

² Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)

control/Положительный контроль, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC**. Для калибраторов – 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!

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 «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

Анализ результатов амплификации ДНК *Staphylococcus aureus* по каналу FAM/Green:

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
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. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В отрицательном контроле экстракции (B-) – **ОКО** – отсутствует значение *Ct*.
8. В отрицательном контроле (K-) ПЦР – **ДНК-буфер** – отсутствует значение *Ct*.

9. В ДНК-калибраторах должны появиться значения C_t и значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**).
10. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК MRSA** - должно появиться значение C_t и значение концентрации.

Анализ результатов реакции амплификации ДНК гена mecA по каналу JOE/Yellow:

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
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. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В отрицательном контроле экстракции (В–) – **ОКО** – отсутствует значение C_t .
8. В отрицательном контроле ПЦР (К–) – **ДНК-буфер** – отсутствует значение C_t .
9. В ДНК-калибраторах должны появиться значения C_t и значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**).
10. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК MRSA** - должно появиться значение C_t и значение концентрации.

Анализ результатов амплификации по каналу ROX/Orange (ВКО STI-87):

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
 2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
 3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
 4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope**
- Формат FRT Форма 2: **REF** R-B78-100-FT(RG,iQ), **REF** H-1902-1-1 / **VER** 24.03.21 / стр. 11 из 14

Correct/Коррект.уклона.

5. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
6. Выберите 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 **Quant. Results/Количественные Результаты**) должны появиться значения *C_t* и значения концентраций для **ВКО STI-87** в каждом исследуемом образце (Calc Conc (copies/reaction)). При этом значения должны быть более значения, указанного во вкладыше.
8. В отрицательном контроле ПЦР (К-) – **ДНК-буфер** – отсутствует значение *C_t*.
9. В ДНК-калибраторах должны появиться значения *C_t* и значения концентраций (Calc Conc (copies/reaction)).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ И 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 одноразовых полипропиленовых микропробирок для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Axugen, США).

1. Включить прибор, открыть программу iCycler/iQ5.

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

2. Поместить микропробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Следите 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 переворачивайте стрипы при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать соответствующие параметры амплификации

Программа амплификации «MRSA» для приборов планшетного типа³

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	55	30 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	15 с	–	40
	55	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	72	15 с	–	

3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.

³ Например, iCycler iQ, iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США)

5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-». Калибраторы по каналу **JOE/HEX** и **FAM** и **ROX** задать как **Standard** и указать концентрацию из вкладыша к набору реагентов. При задании калибраторов кнопка **Whole Plate Loading** должна быть не активирована. Для всех образцов и калибраторов задать измерение флуоресценции по трем каналам JOE/HEX, FAM, ROX.
6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

Анализ результатов.

Анализ результатов проводится по каналам JOE/HEX и FAM.

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. Просматривайте данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысьте уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговых линий (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов. В таблице результатов (окно **Quant. Results**) появятся значения Ct для анализируемого канала.
4. Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или активировав кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (iQ5).

Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с вкладышем к набору реагентов.