

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

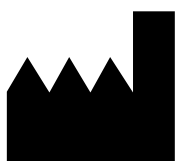
по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Yersinia pestis*

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

«АмплиСенс[®] *Yersinia pestis*-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
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия)	15

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Yersinia pestis*-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 и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия).

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

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

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – русифицированную программу Rotor-Gene 6000 версии 1.8.17.5 (или выше), или 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 работе с прибором Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки).

Поместить пробирки 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.

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** и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками (Rotor-Gene 3000) / одето фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. 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**.

5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры (см. табл. 1):

Таблица 1

Программа амплификации

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

6. Нажать кнопку **ОК/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**
- осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st 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**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперименту 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 и контрольных образцов. 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 C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green (ВКО STI-87):

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 активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**, исключить циклы до 5.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным 10 %.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения C_t .

Анализ результатов амплификации по каналу JOE/Yellow (ДНК *Yersinia pestis*):

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 кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. Уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**, исключить циклы до 5.
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 C_t .

ВНИМАНИЕ! При анализе кривых флуоресценции по всем каналам в том случае, если кривые флуоресценции не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ**) равным **15 %**.

Интерпретация результатов

Интерпретация результатов в контрольных образцах:

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2

**Результаты анализа контрольных образцов для приборов
Rotor-Gene 3000/6000/Q**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)	
		FAM/Green	JOE/Yellow
		Детекция ВКО	Детекция <i>Y.pestis</i>
OK	Экстракция ДНК	< 24	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	< 27	< 23

Интерпретация результатов в исследуемых образцах:

- ДНК *Y.pestis* обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение (см. таблицу 3). При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Y.pestis* не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение (см. таблицу 3), а по каналу JOE/Yellow, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, значение порогового цикла не определено.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу JOE/Yellow и по каналу FAM/Green значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

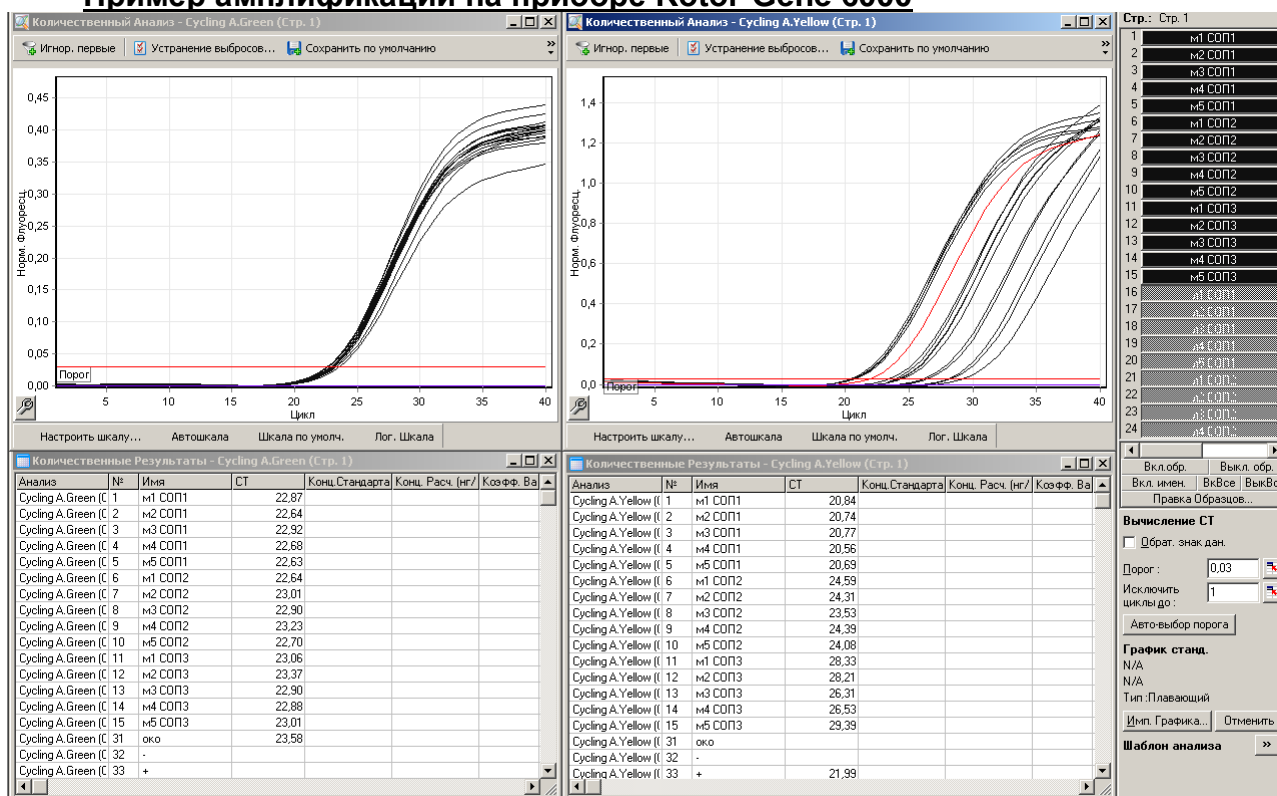
Интерпретация результатов в исследуемых образцах для приборов Rotor-Gene 3000/6000/Q

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу (пороговые циклы)	
	FAM/Green	JOE/Yellow
	Детекция ВКО	Детекция <i>Y.pestis</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Yersinia pestis</i>	< 27	< 38

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу JOE/Yellow отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу JOE/Yellow и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК.

Пример амплификации на приборе Rotor-Gene 6000



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ 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. При работе с прибором iCycler iQ5 рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Axugen, США).

Проведение реакции амплификации

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/iQ5*.
3. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках:
 - Для прибора **iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета возможно в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам FAM и JOE/HEX. Задать объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
 - 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**. 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 использованный ранее **Plate Setup**. 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 (табл. 4).

Программа амплификации

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530	
	72	15 с	–	

- Для прибора **iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить 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 прибора **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** (файл с расширением **.tmo**) 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 предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой:

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

- Для прибора **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 **Use Persistent Well Factors**.

Аmplификацию необходимо проводить с использованием такого же типа пластика, в котором проводилась калибровка прибора. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**. Выбрать тип крышек (**Seal Type – Domed cap**), тип пробирок (**Vessel Type – Tubes**).

- 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 **Persistent 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**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Результаты анализируются на основании наличия (или отсутствия) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна иметь выраженную S-образную форму на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции и однократно пересекать пороговую линию.

Обработка данных

- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** 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 Report** выбрать значок соответствующего канала. 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**. Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения C_t .
- Для прибора **iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по соответствующему каналу. При этом должен быть выбран режим анализа данных

PCR Base Line Subtracted Curve Fit (выбирается по умолчанию).

Анализ результатов амплификации

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО:

1. Нажать в меню анализа данных (**Data Analysis**) кнопку **FAM**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. Установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 20**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 50**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК *Yersinia pestis*:

1. Нажать в меню анализа данных (**Data Analysis**) кнопку **JOE**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. В открывшемся окне установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 10**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 100**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения **Ct**.

Интерпретация результатов

Интерпретация результатов в контрольных образцах:

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК (таблица 5).

Таблица 5

Результаты анализа контрольных образцов для приборов iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США)

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)	
		FAM/FAM-490	JOE/HEX/JOE-530
		Детекция ВКО	Детекция <i>Y.pestis</i>
OK	Экстракция НК	< 28	<u>отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К+	ПЦР	< 31	< 30

Интерпретация результатов в исследуемых образцах:

- ДНК *Y.pestis* обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX/JOE-530 определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение (см. таблицу 6). При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Y.pestis* не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/FAM-490 определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение (см. таблицу 6). А по каналу JOE/HEX/JOE-530, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, не определено значение порогового цикла.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу JOE/HEX/JOE-530 и по каналу FAM/FAM-490 значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Таблица 6

**Результаты анализа исследуемых образцов для приборов
iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США)**

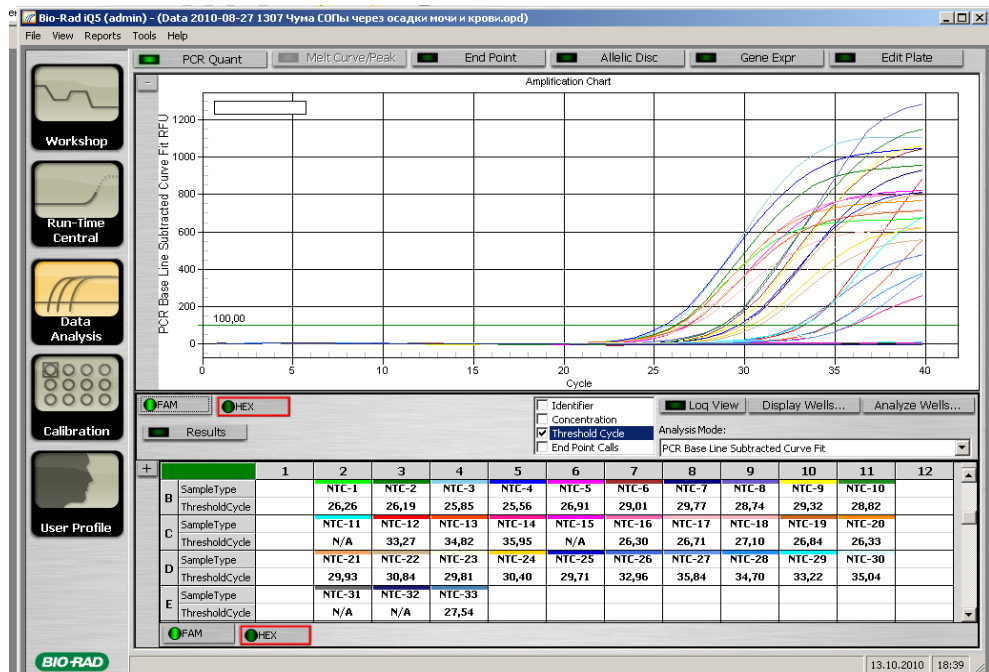
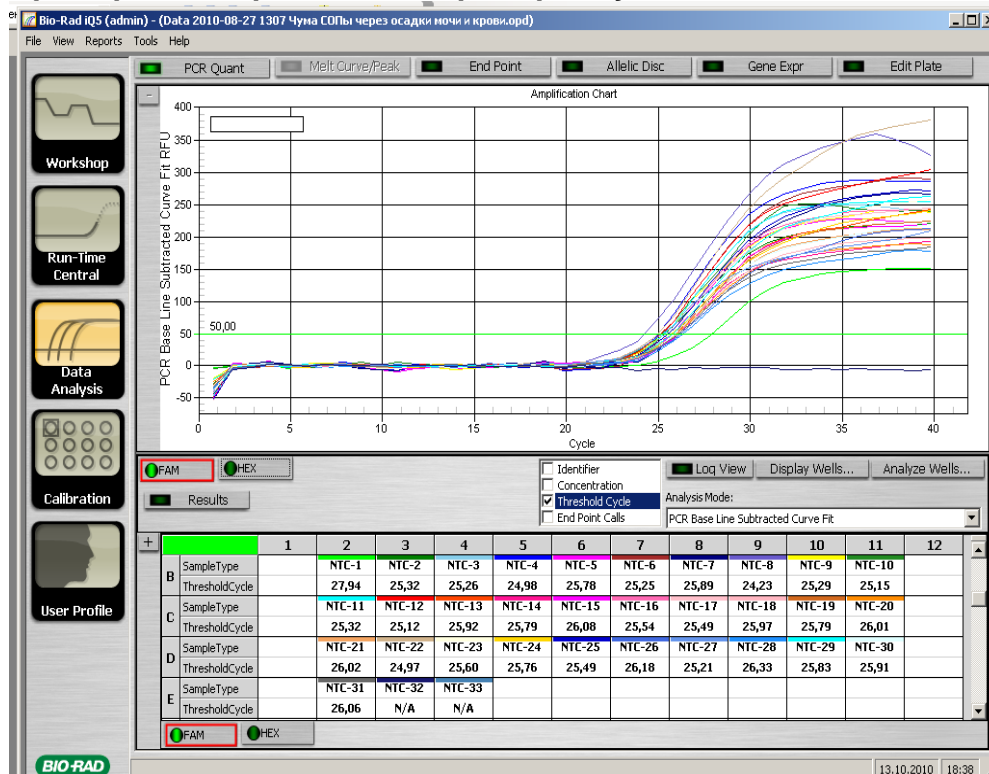
ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу (пороговые циклы)	
	FAM/FAM-490	JOE/HEX/JOE-530
	Детекция ВКО	Детекция <i>Y.pestis</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Yersinia pestis</i>	< 31	< 39

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

- Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу JOE/HEX/JOE-530 отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу JOE/HEX/JOE-530 и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по какому-либо из каналов

определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК.

Пример амплификации на приборе iCycler iQ5



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия)

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 – положительный – **1**, отрицательный – **1**;
 - Объем рабочей смеси в пробирке – **25 мкл**;
 - Флуорофоры: **FAM – ВКО; HEX – Специфика**.
5. Задать программу амплификации с применением команды **Создать новую программу/редактировать программу** (см. табл.7):

Таблица 7

Программа амплификации

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	Fam, Hex	
	72	15 с	–	

6. 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**.

7. 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! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте стриппы/плашку при установке в прибор.

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

Анализ результатов

Обработка данных

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Качественный**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый Ст.**
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. В открывшейся вкладке установить **Критерий положительного результата ПЦР – 60 %**, **Величина Threshold – 10**, **Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 5 %**. Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку **Применить**.
5. Отключить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Φ** (отжать кнопку).
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии.

Поочередно для каналов Fam и Hex установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на значении, при котором кривые флуоресценции носят сигмовидный характер. Рекомендуемая пороговая линия для каналов Fam и Hex – **20**. В том случае, если кривые флуоресценции пересекают пороговую линию, не имея характерную сигмовидную форму, уровень пороговой линии необходимо повысить. 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**Интерпретация результатов в контрольных образцах:**

Результаты исследования считаются достоверными только в случае получения правильных результатов исследования отрицательного и положительного контролей амплификации и экстракции НК.

Таблица 8

**Результаты анализа контрольных образцов для прибора
«ДТ-96» («ДНК-технология», Россия)**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу (пороговые циклы)	
		Fam	Hex
		<u>Детекция ВКО</u>	<u>Детекция <i>Y.pestis</i></u>
OK	Экстракция НК	< 28	<u>отсутствует</u>
K-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
K+	ПЦР	< 31	< 30

Интерпретация результатов в исследуемых образцах:

- ДНК *Y.pestis* обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Hex определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение (см. таблицу 9). При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Y.pestis* не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Fam определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение (см. таблицу 9). А по каналу Hex, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, не определено значение порогового цикла.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналу Hex и по каналу Fam значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Таблица 9

**Результаты анализа исследуемых образцов для прибора
«ДТ-96» («ДНК-технология», Россия)**

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу (пороговые циклы)	
	Fam	Hex
	<u>Детекция ВКО</u>	<u>Детекция <i>Y.pestis</i></u>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Yersinia pestis</i>	< 30	< 39

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

- Образцы (кроме К-), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К- отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу Нех отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу Нех и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК.

Пример амплификации на приборе «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия)

