

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

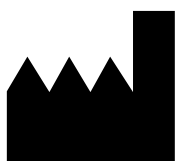
по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *Bordetella* multi-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, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) .....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай) .....	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) .....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) .....	19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США) .....	25

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и идентификации специфических фрагментов генома возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации – «АмплиСенс® *Bordetella* multi-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),
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай),
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).
- iCycler iQ, iCycler 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 <sup>1</sup>
Канал для флуорофора FAM	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/JOE-530/Yellow/Cy3
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/ROX-575/TxR
Канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red/Cy5-635/Quasar705

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

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)**

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, 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 англоязычной версии программы 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 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) или пробирок на 0,1 мл.

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** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-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):

Программа амплификации ДНК *Bordetella multi-FL*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	<b>5 мин</b> (для варианта FRT) или <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, Cy5/Red	
	72	10 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, ROX/Orange** и **Cy5/Red** (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**);
  - Установить калибровки канала для всех красителей от **5FI** до **10FI** (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Закреть**.
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****Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green (ВКО):**

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 = 0.1**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным **0 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

**Анализ результатов реакции амплификации по каналу JOE/Yellow (Bordetella):**

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**.
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 установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным **5 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

**Анализ результатов реакции амплификации по каналу ROX/Orange (Bordetella pertussis):**

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 кнопку **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 установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным **5 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

#### **Анализ результатов реакции амплификации по каналу Cy5/Red (Bordetella bronchiseptica):**

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. Cy5/Cycling A. Red, 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.**
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 установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона - ПФ**) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

#### **Интерпретация результатов**

Интерпретацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла **Ct** в соответствующей графе в таблице результатов.

#### **Принцип интерпретации результатов амплификации следующий:**

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red):

Канал детекции	FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
Реакция	Детекция ВКО	Обнаружение гена коклюшного токсина, <i>ptxA</i>	Идентификация <i>Bordetella pertussis</i>	Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i>

Данные ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 2).

Таблица 2

### Результаты контрольных реакций ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>			
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
		Детекция ВКО	Обнаружение коклюшного токсина	Идентификация <i>Bordetella pertussis</i>	Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i>
OK	Экстракция РНК/ДНК	<28	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
K-	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
BK+	ПЦР	<26	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
K+	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<25	<25	<26

Интерпретация результатов ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) проводится на основании сочетания результатов анализа амплификации в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

### Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Варианты	FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red	Результат
	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>				
1	<u>Отсутствует</u> или >27	<u>Отсутствует</u> или >25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Невалидный
2	<27	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. bronchiseptica</i> НЕ обнаружены
3	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	≤35	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B. pertussis</i>
4	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	<u>Отсутствует</u>	≤35	Обнаружена ДНК <i>B. bronchiseptica</i>
5	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	<25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B. parapertussis</i>



6	<27	>25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>Bordetella</i> spp: <i>B.pertussis</i> , или <i>B.parapertussis</i> , или <i>B.bronchiseptica</i> . Для проведения видового типирования необходимо повторное взятие материала
7	<27	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	<u>Отсутствует</u>	При повторении считать сомнительным
8	<27	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	При повторении считать сомнительным

- ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **JOE/Yellow**, **ROX/Orange** и **Cy5/Red** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM/Green**) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 27 (см. табл. 3).
- **Обнаружена** ДНК *B. pertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **JOE/Yellow** и **ROX/Orange** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM/Green**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. bronchiseptica*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **JOE/Yellow** и **Cy5/Red** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM/Green**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. parapertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow** определено значение *Ct*, не превышающее 25, и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам **ROX/Orange** и **Cy5/Red**. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM/Green**)

может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.

- Если для исследуемой пробы в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow** определено значение *Ct* более 25 и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам **ROX/Orange** и **Cy5/Red**, а по каналу для ВКО (**FAM/Green**) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 27, можно сделать вывод, что **обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*)**, но для проведения видовой идентификации количества экстрагированной ДНК недостаточно, и при необходимости идентификации требуется повторное взятие клинического материала.
- Если для исследуемой пробы в таблице результатов отсутствует значение порогового цикла *Ct* по каналу **JOE/Yellow**, но определяется значение порогового цикла *Ct* по каналу **ROX/Orange** или **Cy5/Red**, и по каналу для ВКО (**FAM/Green**) значение порогового цикла *Ct* не превышает 27, требуется повторное исследование данной пробы с этапа ПЦР. При повторении результата считать данную пробу **сомнительной** и рекомендовать повторить взятие клинического материала для исследования.
- Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналам детекции **ROX/Orange** и **Cy5/Red**, по каналу **JOE/Yellow** значение *Ct* отсутствует или более 25, и по каналу для ВКО (**FAM/Green**) значение *Ct* также отсутствует или более 27. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 2), необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) регистрируется сигнал по каналам детекции **JOE/Yellow**, **ROX/Orange** и **Cy5/Red**, необходимо ликвидировать источник возможной контаминации и повторить исследование для всех положительных образцов, 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, Ахуген, Инс. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Инс. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через дно пробирки).

**Запуск прибора и анализ результатов проводить при помощи программного обеспечения FRT Manager.**

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, 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 или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, США) (детекция через крышку пробирки).

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 по каналам **FAM, JOE/HEX, ROX** и **Cy5**.
  - Для прибора **iCycler 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**. 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, JOE, ROX** и **Cy5**. 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 (см. табл. 4).

Таблица 4

Программа амплификации *Bordetella multi-FL*

Цикл	Температура, °C	Время	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, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	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 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 **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**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

### Анализ результатов

Результаты анализируются на основании наличия (или отсутствия) значения порогового цикла *Ct* 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.

- 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 соответствующему каналу. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- 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 Reporter** 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.

- Для канала FAM установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на уровне **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.
- Поочередно для каналов JOE/HEX, ROX и Cy5 установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на уровне **10 %** 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 на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

### Интерпретация результатов

Принцип интерпретации результатов амплификации следующий:

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам (FAM, JOE/HEX, ROX и Cy5):

Канал детекции	FAM	JOE/HEX	ROX	Cy5
Реакция	Детекция ВКО	Обнаружение гена коклюшного токсина, <i>ptxA</i>	Идентификация <i>Bordetella pertussis</i>	Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i>

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

Таблица 5

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу			
		FAM	JOE/HEX	ROX	Cy5
		Пороговое значение для детекции ВКО	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя

К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
OK	Экстракция РНК/ДНК	<30	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	<27	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К+	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<28	<26	<26

Интерпретация результатов ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) проводится на основании сочетания результатов анализа амплификации в соответствии с табл. 6.

Таблица 6

### Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Варианты	FAM	JOE/HEX	ROX	Sy5	Результат
	Значение порогового цикла, Ct				
1	<u>Отсутствует</u> или >29	<u>Отсутствует</u> или >25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Невалидный
2	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<i>B.pertussis</i> <i>B.parapertussis</i> <i>B.bronchiseptica</i> HE обнаружены
3	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	≤35	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B.pertussis</i>
4	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	<u>Отсутствует</u>	≤35	Обнаружена ДНК <i>B.bronchiseptica</i>
5	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	<25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B.parapertussis</i>
6	<29	>25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>Bordetella</i> spp: <i>B.pertussis</i> , или <i>B.parapertussis</i> , или <i>B.bronchiseptica</i> . Для проведения видового типирования необходимо повторное взятие материала
7	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	<u>Отсутствует</u>	При повторении считать сомнительным
8	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	При повторении считать сомнительным

- ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* не обнаружены, если для данной пробы в таблице результатов по каналам JOE/HEX, ROX и Sy5 не



- определено (отсутствует) значение порогового цикла  $Ct$  (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) определено значение порогового цикла  $Ct$ , не превышающее 29 (см. табл. 6).
- **Обнаружена** ДНК *B. pertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **JOE/HEX** и **ROX** определяется значение порогового цикла  $Ct$ , не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла  $Ct$  в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
  - **Обнаружена** ДНК *B. bronchiseptica*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **JOE/HEX** и **Cy5** определяется значение порогового цикла  $Ct$ , не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла  $Ct$  в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
  - **Обнаружена** ДНК *B. parapertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу **JOE/HEX** определено значение  $Ct$  не превышающее 25 и отсутствуют значения порогового цикла  $Ct$  по каналам **ROX** и **Cy5**. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла  $Ct$  в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
  - Если для исследуемой пробы в таблице результатов по каналу **JOE/HEX** определено значение  $Ct$  более 25 и отсутствуют значения порогового цикла  $Ct$  по каналам **ROX** и **Cy5**, а по каналу для ВКО (**FAM**) определено значение порогового цикла  $Ct$ , не превышающее 29, можно сделать вывод, что **обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*)**, но для проведения видовой идентификации количества экстрагированной ДНК недостаточно, и при необходимости идентификации требуется повторное взятие клинического материала.
  - Если для исследуемой пробы в таблице результатов отсутствует значение порогового цикла  $Ct$  по каналу **JOE/HEX**, но определяется значение порогового

цикла *Ct* по каналу **ROX** или **Cy5**, и по каналу для ВКО (**FAM**) значение порогового цикла *Ct* не превышает 29, требуется повторное исследование данной пробы с этапа ПЦР. При повторении результата считать данную пробу **сомнительной** и рекомендовать повторить взятие клинического материала для исследования.

- Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналам детекции **ROX** и **Cy5**, по каналу **JOE/HEX** значение *Ct* отсутствует или более 25 и по каналу для ВКО (**FAM**) значение *Ct* также отсутствует или более 29. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 5), необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) регистрируется сигнал по каналам детекции **JOE/HEX**, **ROX** и **Cy5**, необходимо ликвидировать источник возможной контаминации и повторить исследование для всех положительных образцов, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («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 или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

**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 – ВК; HEX – специфика; ROX – специфика; Cy5 – специфика.
5. Задать программу амплификации с применением команды **Создать новую программу/редактировать программу** (см. табл. 7).

Программа амплификации *Bordetella multi-FL*

Цикл	Температура, °С	Время	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, Cy5	
	72	25 с		

6. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать соответствующее название теста, указать количество образцов и нажать **ОК**.
  7. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне **Свободное заполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
  8. Указать **Объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
  9. 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 стрипы/плашку при установке в прибор.
10. Последовательно нажать кнопки **Закрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

**Анализ результатов**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

## Обработка данных

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct (Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый Ct**.
4. Отключить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Φ** (отжать кнопку).
5. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. В открывшейся вкладке установить **Критерий положительного результата ПЦР – 60 %**, **Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 10%**, **верхняя граница/порог нормализации данных – 10 %**. Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку **Применить**.
6. Для канала Fam установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на уровне **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.
7. Поочередно для каналов Hex, Rox и Cy5 установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на уровне **10 %** 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

Принцип интерпретации результатов амплификации следующий:

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам (Fam, Hex, Rox и Cy5):

Канал детекции	Fam	Hex	Rox	Cy5
Реакция	Детекция ВКО	Обнаружение гена коклюшного токсина, <i>ptxA</i>	Идентификация <i>Bordetella pertussis</i>	Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i>

Данные ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 8).

Таблица 8

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу			
		Fam	Hex	Rox	Sy5
		Пороговое значение для детекции ВКО	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя
К-	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ОК	Экстракция РНК/ДНК	<30	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	<28	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К+	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<28	<26	<27

Интерпретация результатов ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) проводится на основании сочетания результатов анализа амплификации в соответствии с табл. 9.

Таблица 9

**Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов**

Варианты	Fam	Hex	Rox	Sy5	Результат
	Значение порогового цикла, Ct				
1	<u>Отсутствует</u> или >29	<u>Отсутствует</u> или >25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Невалидный
2	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<i>B.pertussis</i> <i>B.parapertussis</i> <i>B.bronchiseptica</i> НЕ обнаружены
3	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	≤35	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B.pertussis</i>
4	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	<u>Отсутствует</u>	≤35	Обнаружена ДНК <i>B.bronchiseptica</i>
5	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	<25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B.parapertussis</i>
6	<29	>25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>Bordetella</i> spp: <i>B.pertussis</i> , или

					<i>B.parapertussis</i> , или <i>B.bronchiseptica</i> . Для проведения видового типирования необходимо повторное взятие материала
7	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	<u>Отсутствует</u>	При повторении считать сомнительным
8	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	При повторении считать сомнительным

- ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **Hex**, **Rox** и **Cy5** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для ВКО (**Fam**) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 29 (см. табл. 9).
- **Обнаружена** ДНК *B. pertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **Hex** и **Rox** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**Fam**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. bronchiseptica*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **Hex** и **Cy5** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**Fam**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. parapertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу **Hex** определено значение *Ct* не превышающее 25 и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам **Rox** и **Cy5**. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**Fam**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.

- Если для исследуемой пробы в таблице результатов по каналу **Hex** определено значение *Ct* более 25 и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам **Rox** и **Cy5**, а по каналу для ВКО (**Fam**) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 29, можно сделать вывод, что **обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*)**, но для проведения видовой идентификации количества экстрагированной ДНК недостаточно, и при необходимости идентификации требуется повторное взятие клинического материала.
- Если для исследуемой пробы в таблице результатов отсутствует значение порогового цикла *Ct* по каналу **Hex**, но определяется значение порогового цикла *Ct* по каналу **Rox** или **Cy5**, и по каналу для ВКО (**Fam**) значение порогового цикла *Ct* не превышает 29, требуется повторное исследование данной пробы с этапа ПЦР. При повторении результата считать данную пробу **сомнительной** и рекомендовать повторить взятие клинического материала для исследования.
- Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналам детекции **Rox** и **Cy5**, по каналу **Hex** значение *Ct* отсутствует или более 25, и по каналу для ВКО (**Fam**) значение *Ct* также отсутствует или более 29. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК/РНК.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 8), необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) регистрируется сигнал по каналам детекции **Hex**, **Rox** и **Cy5**, необходимо ликвидировать источник возможной контаминации и повторить исследование для всех положительных образцов, чтобы исключить следствие возможной контаминации.



## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, 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 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:

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

### Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
2. 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. 10). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Таблица 10

### Программа амплификации ДНК *Bordetella* multi-FL

Этап	Температура, °C	Время	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, Cy5	
	72	25 с		

**ВНИМАНИЕ!** Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options* задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**.

3. 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.
4. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать Сохранить.
6. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

**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 пробирки (стрипы) при установке в прибор.

7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

#### **Использование готового шаблона для проведения теста**

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать

кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

### **Анализ результатов:**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

Поочередно для каждого канала FAM, HEX, ROX и Cy5 установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на уровне 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 образцов (см. табл. 11).

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

Таблица 11

### **Результаты анализа контрольных образцов**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу			
		FAM	HEX	ROX	Cy5
		Пороговое значение для детекции ВКО	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя	Пороговое значение для детекции возбудителя
К–	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
ОК	Экстракция РНК/ДНК	<30	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>

ВК+	ПЦР	<27	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>	<u>отсутствует</u>
К+	ПЦР	<u>отсутствует</u>	<28	<26	<26

Интерпретация результатов ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) проводится на основании сочетания результатов анализа амплификации в соответствии с табл. 12.

Таблица 12

### Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Варианты	FAM	HEX	ROX	Cy5	Результат
	Значение порогового цикла, Ct				
1	<u>Отсутствует</u> или >29	<u>Отсутствует</u> или >25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Невалидный
2	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<i>B.pertussis</i> <i>B.parapertussis</i> <i>B.bronchiseptica</i> HE обнаружены
3	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	≤35	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B.pertussis</i>
4	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	≤35	<u>Отсутствует</u>	≤35	Обнаружена ДНК <i>B.bronchiseptica</i>
5	≤35 /либо <u>Отсутствует</u>	<25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>B.parapertussis</i>
6	<29	>25	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>Bordetella</i> spp: <i>B.pertussis</i> , или <i>B.parapertussis</i> , или <i>B.bronchiseptica</i> . Для проведения видового типирования необходимо повторное взятие материала
7	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	<u>Отсутствует</u>	При повторении считать сомнительным
8	<29	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Определено</u>	При повторении считать сомнительным

- ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* не обнаружены, если для данной пробы в таблице результатов по каналам HEX, ROX и Cy5 не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для ВКО (FAM) определено значение порогового цикла Ct, не превышающее 29 (см. табл. 12).

- **Обнаружена** ДНК *B. pertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **HEX** и **ROX** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. bronchiseptica*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам **HEX** и **Cy5** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 35. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. parapertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу **HEX** определено значение *Ct* не превышающее 25 и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам **ROX** и **Cy5**. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- Если для исследуемой пробы в таблице результатов по каналу **HEX** определено значение *Ct* более 25 и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам **ROX** и **Cy5**, а по каналу для ВКО (**FAM**) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 29, можно сделать вывод, что **обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*)**, но для проведения видовой идентификации количества экстрагированной ДНК недостаточно, и при необходимости идентификации требуется повторное взятие клинического материала.
- Если для исследуемой пробы в таблице результатов отсутствует значение порогового цикла *Ct* по каналу **HEX**, но определяется значение порогового цикла *Ct* по каналу **ROX** или **Cy5**, и по каналу для ВКО (**FAM**) значение порогового цикла *Ct* не превышает 29, требуется повторное исследование данной пробы с этапа ПЦР. При повторении результата считать данную пробу **сомнительной** и рекомендовать повторить взятие клинического материала для исследования.

- Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла  $C_t$  по каналам детекции **ROX** и **Cy5**, по каналу **HEX** значение  $C_t$  отсутствует или более 25 и по каналу для ВКО (**FAM**) значение  $C_t$  также отсутствует или более 29. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 11), необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) регистрируется сигнал по каналам детекции **HEX**, **ROX** и **Cy5**, необходимо ликвидировать источник возможной контаминации и повторить исследование для всех положительных образцов, чтобы исключить следствие возможной контаминации.