

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii)*

в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Pneumocystis jirovecii (carinii)*-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 И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США)	11

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii)* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Pneumocystis jirovecii (carinii)*-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 iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США).

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), 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 прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для 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 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.

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Установить пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene 3000/6000/Q (ячейки карусели пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе). Запрограммировать прибор. **ВНИМАНИЕ!** Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).
3. Задать программу амплификации для приборов роторного типа (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа амплификации «АмплиСенс-1 RG» для приборов роторного типа

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	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Универсальная программа амплификации и детекции «АмплиСенс-1 RG» позволяет одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП). Аналитические характеристики данного

набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

4. Задать параметры калибрования (активировать **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** в мастере нового эксперимента):
 - осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (активировать **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - осуществлять калибрование по каналам FAM/Green, JOE/Yellow перед первым измерением (активировать **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - установить калибровки для каналов FAM/Green и JOE/Yellow по первой пробирке от 5FI до 10FI (активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала**).
5. Запустить программу амплификации, активировав **Start Run/Старт**, и присвоить название эксперименту.
6. В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение исследуемых образцов, отрицательного контроля экстракции, а также положительного и отрицательного контролей амплификации ДНК.

Для этого необходимо внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль экстракции обозначить как «OK», положительный контроль ПЦР обозначить как «К+», отрицательный – как «К-». Напротив всех исследуемых образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контролей – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля экстракции – тип **Negative control/Отрицательный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC/ОТР. (ПФ)**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

ВНИМАНИЕ! При установке типа **None/Пусто** данные образца анализироваться не будут.

Анализ результатов

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** и **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.

2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (FAM/Green и JOE/Yellow) **Threshold/Порог**.
3. В меню каждого основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню СТ **Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03** и установить значение **More settings/Удаление выбросов – 10 %**.
5. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.
6. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов:
 - в отрицательном контроле экстракции (ОК) – ОКО – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в отрицательном контроле ПЦР (К–) – ТЕ-буфер – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в положительном контроле ПЦР (К+) – ПКО ДНК *P.jirovecii* и ДНК человека – значение *Ct* не должно превышать значение, указанное во вкладыше.
7. Пробы, в которых по каналу JOE/Yellow появились значения *Ct*, не превышающие **35** циклов, считаются положительными. Если значение *Ct* в пробе превышает этот порог, то результат считается **сомнительным** и необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений результат считается сомнительным.

Возможные ошибки

1. Появление любого значения *Ct* по каналу JOE/Yellow (*Pneumocystis jirovecii* (*carinii*)) и/или FAM/Green (ВКО Glob) в таблице результатов для отрицательного контроля этапа экстракции (ОК) и отрицательного контроля этапа ПЦР (К–) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля ПЦР (К+)

- ПКО ДНК *P.jirovecii* и ДНК человека – по каналам FAM/Green, JOE/Yellow отсутствует, результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов начиная с этапа ПЦР.
3. Если значения *Ct* по каналу FAM/Green (ВКО Glob) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют, это означает сбой этапа экстракции. Необходимо повторить анализ для этих образцов начиная с этапа экстракции.
 4. Если для анализируемого образца значение *Ct* ВКО Glob превышает 30, а значение *Ct* ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii)* больше 35, то необходимо провести повторный анализ данного образца начиная с этапа экстракции. Высокие значения *Ct* могут быть вызваны потерями ДНК при экстракции или наличием ингибиторов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора iCycler iQ5 рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

Проведение реакции амплификации

1. Включить прибор и оптический модуль за 20-30 мин до проведения реакции.
2. Задать программу амплификации (**Protocol**) для приборов планшетного типа (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	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, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Универсальная программа амплификации и детекции «АмплиСенс-1» позволяет одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП). Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

3. Задать расположение проб на платформе (**Plate**), выбрать флуорофоры (**Select/add fluorophores**), активировать флуорофоры для проб в созданном протоколе с помощью клавиши **Fluorophore loading in Whole Plate mode**, выбрать **Sample Volume – 25 мкл**, **Seal Type – Domed Cap**, **Vessel Type – Tubes**, затем сохранить созданный протокол **Save/Exit Plate Editing**.
4. После этого внести реактивы для амплификации и ДНК проб в пробирки и поставить их в прибор.
5. Запустить прибор (**Run**), выбрать **Run Persistent Plate** и сохранить эксперимент.

Анализ результатов

1. Анализ результатов проводится по каналам JOE/HEX и FAM.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Data Analysis**.
3. Выбрать **Base line** в **Crossing Threshold User Defined** в диапазоне **20-25**. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать кривые другой формы. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
4. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов:
 - в **отрицательном контроле экстракции (OK) – ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в **отрицательном контроле ПЦР (K–) – ТЕ-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в **положительном контроле ПЦР (K+) – ПКО ДНК *P.jirovecii* и ДНК человека** – значение *Ct* не должно превышать значение, указанное во вкладыше.
5. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие значения порогового цикла, указанного во вкладыше, считаются положительными. Если значение *Ct* в пробе превышает значения порогового цикла, то результат считается сомнительным. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений результат считается сомнительным.

Возможные ошибки

1. Появление любого значения *Ct* по каналу JOE/HEX (*Pneumocystis jirovecii (carinii)*) и/или FAM (ВКО Glob) в таблице результатов для отрицательного контроля этапа экстракции (OK) и отрицательного контроля этапа ПЦР (K–) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля ПЦР (К+) – ПКО ДНК *P.jirovecii* и ДНК человека – по каналам FAM, JOE/HEX отсутствует, результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов начиная с этапа ПЦР.
3. Значения *Ct* по каналу FAM (ВКО Glob) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют, это означает сбой этапа экстракции. Необходимо повторить анализ для этих образцов начиная с этапа экстракции.
4. Если для анализируемого образца значение *Ct* ВКО Glob превышает 30, а значение *Ct* ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii)* больше 35, то необходимо провести повторный анализ данного образца начиная с этапа экстракции. Высокие значения *Ct* могут быть вызваны потерями ДНК при экстракции или наличием ингибиторов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США)

1. Включите прибор, запустите программу Stratagene Mx3000P/Mx3005P.
2. В окне **New Experiment Options** выберите пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установите флажок **Turn lamp on for warm-up**.

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

3. Установите пробирки в прибор, закройте крышку.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configurations** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **HEX/JOE filter set** установить параметр **JOE**, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр **FAM**.

ВНИМАНИЕ! Будьте внимательны! Не разворачивайте стрипы/плашку при установке в прибор.

5. Закройте фиксатор и дверцу прибора.
6. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.

7. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью);
 - обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить два флажка **FAM** и **JOE**. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Informations**). Положительный контроль обозначьте как «+», отрицательный контроль как «-». Внести подписи образцов также можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.

8. Перейти на вкладку **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации. Для этого используйте один из следующих способов:

– **Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется):**

1. Нажмите кнопку **Import...** справа от изображения профиля термоциклирования.
2. Перейдите в папку, содержащую предшествующий экспериментальный файл, и откройте его.
3. В окне **Thermal Profile** появится необходимый профиль термоциклирования.

– **Самостоятельное программирование:**

1. После задания всех необходимых значений и параметров снова выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки. Перейти в меню **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации, указанную в табл. 3.

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	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, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Универсальная программа амплификации и детекции «АмплиСенс-1» позволяет одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП). Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации не изменяются.

2. Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data collection marker by dragging** и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.
3. Запустить амплификацию, нажав кнопку **Run**, затем **Start** и присвоив имя файлу эксперимента.

Анализ результатов

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β-глобинового гена (BKO Glob)**, а по другому – **JOE/HEX** – **ДНК Pneumocystis jirovecii (carinii)**.

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

Обработка данных

1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок). В противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Убедиться, что два флуоресцентных канала активны (кнопки **JOE**, **FAM** нажаты в поле **Dyes Shown** внизу окна программы).
5. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив двух флуоресцентных каналов: JOE/HEX, FAM. Проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные² кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысьте уровень порога.
6. В таблице результатов появятся значения *Ct* по обоим каналам для положительного контроля (K+) ПЦР – ПКО ДНК *P.jirovecii* и ДНК человека.
7. Значения *Ct* для **BKO Glob** должны быть в каждом исследуемом образце.
8. В отрицательном контроле экстракции (OK) – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
9. В отрицательном контроле ПЦР (K-) – **ТЕ-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
10. Клинические образцы, в которых появились значения *Ct* по каналу JOE/HEX, не превышающие 35 циклов, считаются положительными. Если значение *Ct* в пробе превышает этот порог, то результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений результат считается сомнительным.

Возможные ошибки

1. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контроля (OK) экстракции и/или для отрицательного контроля (K-) ПЦР по каналам FAM,

² По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, дважды щелкните левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties** для оси Y (Y axis) поставьте галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**.

JOE/HEX свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля (К+) ПЦР по каналам FAM, JOE/HEX отсутствует – результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов начиная с этапа ПЦР.
3. Если значения *Ct* на канале FAM (ВКО Glob) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют, это означает сбой этапа экстракции. Необходимо повторить анализ образцов начиная с этапа экстракции.
4. Если для анализируемого образца значение *Ct* ВКО превышает **30** цикл, а значение *Ct* ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii)* больше **35**, то необходимо провести повторный анализ данного образца начиная с этапа экстракции. Высокие значения *Ct* могут быть вызваны потерями ДНК при экстракции или наличием ингибиторов.