

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Cryptococcus neoformans* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *Cryptococcus neoformans*-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) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad, США).....	7
РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	8

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Cryptococcus neoformans* в биологическом материале (спинномозговая жидкость (СМЖ), бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), мокрота, кровь, пунктаты из очагов поражения кожи, биоптаты и аутоптаты внутренних органов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Cryptococcus neoformans-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).

а также порядок расчета концентрации ДНК *Cryptococcus neoformans* в случае необходимости количественного определения возбудителя.

### 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/Yellow/Cy3

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

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для 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 приборами Rotor-Gene 3000/6000 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.
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.

3. Задать программу амплификации для приборов роторного типа (см. табл. 1):

Таблица 1

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа		
	Температура, °C	Время	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 детекция по каналам FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	

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 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
  - установить калибровки по каналам FAM/Green и JOE/Yellow 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, положительных 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. Положительные контроли ПЦР обозначить как «K+<sub>1</sub>» и «K+<sub>2</sub>», отрицательный – как «K-». 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/Контроль-Фон**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

### 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 **CT Calculation/Вычисление CT** (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 анализу только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов В-, К<sub>+1</sub>, К<sub>+2</sub>, К- в соответствии с пороговыми значениями *Ct*, указанными во вкладыше к набору реагентов.

## 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. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

### 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 «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы планшетного типа		
	Температура, °C	Время	Кол-во 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 детекция по каналам FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	

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**). В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

### Анализ результатов

1. Анализ результатов проводится по каналам JOE/HEX и FAM.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Data Analysis**.

3. Для каждого канала проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать кривые другой формы. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
4. Значения  $C_t$  для исследуемых образцов подлежат учету только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов В-, К<sub>+1</sub>, К<sub>+2</sub>., К- (см. вкладыш к набору реагентов).
5. Значение  $C_t$  для положительных контролей ПЦР К<sub>+1</sub> и К<sub>+2</sub> по соответствующим каналам не должно превышать значений пороговых циклов, указанных во вкладыше к набору реагентов.

### РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК *Cryptococcus neoformans*

В случае необходимости количественного расчета концентрации ДНК *Cryptococcus neoformans* задать для К<sub>+1</sub> и К<sub>+2</sub> – тип **Standard/Стандарт** и указать их концентрации в столбце **Given Conc.** Для К<sub>+1</sub> задать концентрацию – 10000, для К<sub>+2</sub> задать концентрацию – 100.

На основании значений порогового цикла  $C_t$  (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений К<sub>+1</sub> и К<sub>+2</sub> происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК *Cryptococcus neoformans* (по каналу JOE/Yellow/HEX) и ВКО (по каналу FAM/Green) в ПЦР-пробе. Полученные значения используют для расчета концентрации ДНК *Cryptococcus neoformans* в исследуемых образцах по формулам:

- расчет концентрации ДНК *Cryptococcus neoformans* на мл образца при экстракции из 100 мкл:

число копий ДНК *Cryptococcus neoformans* в ПЦР-пробе  $\times 100 =$  коп/мл

- расчет концентрации ДНК *Cryptococcus neoformans* на мл образца при экстракции из объемов, более чем 100 мкл:

число копий ДНК *Cryptococcus neoformans* в ПЦР-пробе  $\times 100 \times N =$  коп/мл

$$N = \frac{100}{\text{объем экстракции, мкл}}$$