

## Методические рекомендации по проведению количественной оценки результата анализа методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) считается одним из наиболее быстрых и точных методов диагностики многих инфекционных заболеваний. Использование метода ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить не только качественный анализ образца на предмет наличия или отсутствия генетической мишени, но и осуществлять количественную оценку содержания целевого маркера в пробе. Количественная оценка необходима для предупреждения гипердиагностики, связанной с наличием ДНК возбудителя ниже диагностически значимого порога, уточнения диагноза и назначения адекватной терапии, получения сопоставимых результатов анализа клинических образцов пациента в процессе мониторинга лечения для корректировки терапии, а также для учёта погрешностей, связанных с забором материала.

Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с контрольными образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. В ходе реакции («в реальном времени») измерение уровня флуоресцентного сигнала пробы, обусловленного накоплением продуктов реакции, проводится в каждом цикле амплификации. По завершению анализа программное обеспечение проводит обработку графиков накопления ДНК, полученных в ходе реакции амплификации, для определения требуемых параметров. Как правило используется один из двух основных подходов к анализу результатов: пороговый метод (определение значения порогового цикла реакции  $C_t$ , threshold cycle, как точки пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии) или метод прямого сравнения графиков (определение значения некоторой точки  $C_p$ , crossing point, на графике накопления ДНК по форме кривой, например – метод максимума второй производной). Оба подхода предполагают нахождение некоторого значения на оси абсцисс (дробного значения цикла реакции), характеризующего данную кривую (найденное значение обычно обозначают как  $C_t$  в случае пороговых методов или  $C_p$  для методов, использующих анализ формы кривой). Полученные значения используют далее при сопоставлении результатов ПЦР для разных образцов.

Суть порогового метода заключается в том, чтобы определить момент  $C_t$  (выраженный в циклах ПЦР), когда количество ДНК в реакционной пробирке (а, следовательно, и флуоресцентный сигнал) достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины (задается пользователем или программным обеспечением). Поскольку значение  $C_t$  обратно пропорционально концентрации ДНК в образце, то возможно проведение количественной оценки содержания ДНК возбудителя в пробе. Сравнивая полученные значения  $C_t$ , можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше  $C_t$ , (т.е. чем быстрее количество ДНК в данном образце достигло пороговой величины), тем больше было в нем целевой ДНК в начальный момент времени. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией ( $C_t$ ). На основании полученных значений  $C_t$  возможно сделать вывод о наличии ДНК возбудителя, а также определить концентрацию обнаруженного патогена. При этом содержание возбудителя в образце может быть

количественно охарактеризовано в абсолютных или относительных значениях концентраций.

## 1. Определение абсолютных значений концентраций ДНК микроорганизмов.

### 1.1. Определение концентрации ДНК с использованием калибровочной прямой.

Для количественной оценки образцов данным методом необходимо при проведении ПЦР анализа в режиме «реального времени» параллельно с исследуемыми пробами проводить амплификацию контрольных образцов с известной концентрацией. Для построения корректной калибровочной прямой необходимо использование не менее двух контрольных образцов с различной концентрацией. Как правило, диагностические наборы имеют в составе серию калибраторов, либо положительный контрольный образец (ПКО) с известной начальной концентрацией ( $C_{\text{ПКО}}$ ), на основе которого возможно приготовление второго контрольного образца.

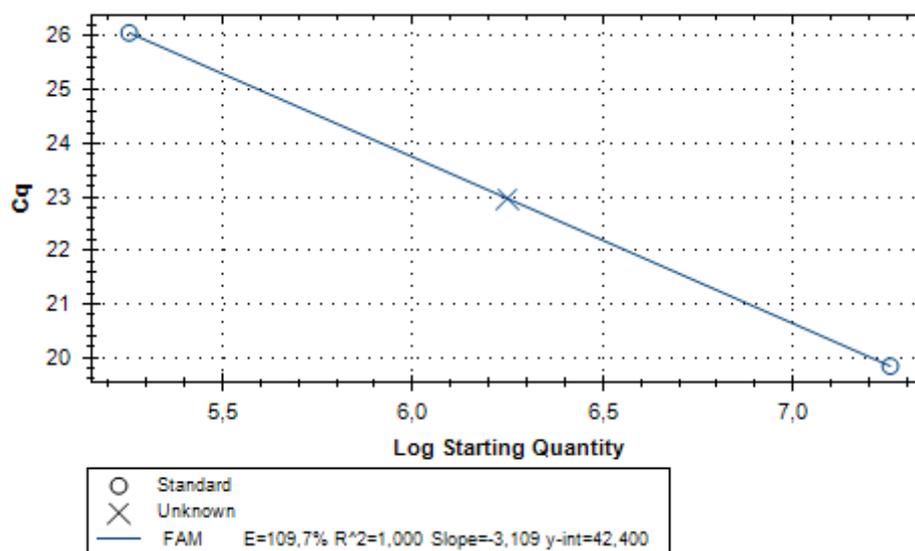
Для приготовления второго контрольного образца необходимо провести десятикратное разведение ПКО из набора по следующей схеме:

Компонент	ПКО	Разбавитель
Количество, мкл	10	90

При необходимости приготовления большего объема второго контрольного образца, возможно пропорциональное увеличение компонентов.

Концентрация второго контрольного образца рассчитывается как  $C_{\text{ПКО}}/10$ .

По окончании реакции с использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией ( $C_t$ ) для всех образцов. На основании данных о концентрации контрольных образцов и соответствующих  $C_t$  программное обеспечение амплификатора строит прямую в координатах  $\lg(\text{концентрация})/C_t$ , используя которую далее вычисляет содержание ДНК в исследуемом образце по рассчитанным ранее значениям  $C_t$ .



1.2. Определение концентрации ДНК возбудителя посредством одного контрольного образца известной концентрации.

Для количественной оценки образцов данным методом необходимо при проведении ПЦР анализа в режиме «реального времени» параллельно с исследуемыми пробами проводить амплификацию ПКО с известной начальной концентрацией. По окончании реакции с использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией ( $C_t$ ) для всех образцов. Пороговый цикл определяют на экспоненциальном участке кривой флуоресценции, где эффективность близка к максимальной во всех образцах. Поскольку значение  $C_t$  обратно пропорционально концентрации ДНК в образце, то возможно проведение количественной оценки содержания ДНК возбудителя в пробе. При этом значение  $C_t$  исследуемого образца сравнивается со значением  $C_t$  ПКО с известной концентрацией. Зная пороговый цикл  $C_t$  для ПКО с известной начальной концентрацией  $C_{ПКО}$  можно вычислить концентрацию исследуемых образцов по следующей формуле:

$$C_{\text{Образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(C_{t\text{ПКО}} - C_{t\text{Образца}})}$$

$C_{\text{Образца}}$  – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце,

$C_{\text{ПКО}}$  – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в ПКО,

$C_{t\text{Образца}}$  – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$C_{t\text{ПКО}}$  – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией;

## 2. Определение относительных значений концентраций ДНК микроорганизмов.

Данный вариант расчета применяется для возможности сопоставления результатов анализа, полученных при мониторинге лечения пациента. Также данный метод позволяет вводить поправку на погрешности, связанные с забором материала. Он возможен для клинического материала, содержащего клетки человека. При этом рассчитываются нормированные значения концентрации ДНК микроорганизмов, отражающие количество клеток микроорганизмов относительно 100 000 клеток слизистой оболочки человека:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК возбудителя}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК возбудителя}}$  - вычисленная концентрация ДНК возбудителя **в образце**,

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$  - вычисленная концентрация ДНК **человека в образце**.

Определение концентрации ДНК возбудителя и человека в образце осуществляется любым из способов, описанных в п.1 настоящих рекомендаций.