

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора

Топорков А.В.

« 20 » 25 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ*
«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДНК
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЦИДИОИДОМИКОЗА
***COCCIDIOIDES IMMITIS* И *COCCIDIOIDES POSADASII* МЕТОДОМ**
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ
«АМПЛИГЕН*COCCIDIOIDES*-PB» ПО ТУ 21.20.23-012-01898084-2016»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «Амплиген*Coccidioides*-PB» по ТУ 21.20.23-012-01898084-2016», далее - набор реагентов «Амплиген*Coccidioides*-PB» предназначен для качественного обнаружения и дифференциации ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза в пробах клинического материала (кровь, мокрота), секционного материала (биоптаты печени, селезенки, легкого), биологического материала от животных (сердце, печень, легкие, селезенка, почки, головной мозг, лимфатические узлы, кровь) и объектов окружающей среды (почва, воздух, смывы с поверхности), а также выделенных культур микромицетов или подозрительных изолятов методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Кокцидиоидомикоз – инфекционное заболевание, вызываемое особо опасными диморфными грибами *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*, которые относят к микроорганизмам II группы патогенности. *C.immitis* эндемичен для Калифорнии (США), а *C.posadasii* имеет значительно более широкое географическое распространение, включая юго-западную часть США, Центральную и Южную Америку. В почвах эндемичных регионов в теплое и дождливое время года возбудители кокцидиоидомикоза растут в виде мицелия. По мере повышения температуры и снижения влажности внутри мицелия образуются артроконидии (артроспоры), которые при дальнейшем высыхании легко распыляются и в большом количестве поступают вместе с пылью в воздух. Основным способом заражения является аэрогенный. Развитие первичной легочной инфекции напрямую зависит от заражающей дозы возбудителя. Инфицирование людей и многих видов млекопитающих происходит при ингаляции артроконидий (артроспор) во время обильной вегетации микромицетов. Опасности заражения подвергаются люди, посещающие эндемичные территории и пациенты при пересадке органов от больных кокцидиоидомикозом. Иммунодефицитное состояние макроорганизма увеличивает риск возникновения заболевания. Аэрозоль микромицета чрезвычайно опасен при манипуляциях в лабораторных условиях, что требует повышенного уровня безопасности при работе с возбудителями кокцидиоидомикоза.

Набор реагентов «Амплиген*Coccidioides*-PB» используется в клинической лабораторной диагностике для исследования материала, полученного от лиц обоего пола, любого возраста с подозрением на кокцидиоидомикоз вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания (в анамнезе находившихся на эндемичных территориях по кокцидиоидомикозу), а также в ходе эпидемиологического мониторинга.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Для проведения исследований могут быть использованы амплификаторы для ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени типа Rotor-Gene.

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 7 реагентов:

*Введена впервые

Таблица 1

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-1 <i>Coccidioides</i>	смесь праймеров, зондов, дНТФ – прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
ПЦР-буфер-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
<i>Taq-F</i> -ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,025	1 пробирка
MgCl ₂	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 25 мМ водный раствор магния хлорида	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Coccidioides</i>	препарат ДНК <i>C. posadasii</i> – прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой раствор ДНК (фрагмент последовательности плазмиды pUC19) в ТЕ-буфере	0,08	1 пробирка
ТЕ-буфер	прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl, Na ₂ -ЭДТА	1,0	1 пробирка

Набор реагентов «Амплиген*Coccidioides*-РВ» рассчитан на проведение 50 определений, включая положительные и отрицательные контроли.

Принцип метода – обнаружение специфических фрагментов ДНК микромицета возбудителя кокцидиоидомикоза основано на использовании мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Метод полимеразной цепной реакции – ПЦР – представляет собой повторяющиеся циклы синтеза – амплификации специфической области ДНК – мишени в присутствии *TaqF* полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора, олигонуклеотидных праймеров и зондов, распознающих ДНК-мишень. При постановке ПЦР применяется «горячий старт», обеспечивающийся использованием химически модифицированной *Taq*-полимеразы – *TaqF* ДНК-полимеразы, которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин, что значительно снижает количество не специфических реакций.

Детекция результатов осуществляется путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ПЦР в режиме реального времени. По каналу FAM/Green детектируется продукт амплификации ДНК *C. immitis* и *C. posadasii*, соответствующего нуклеотидной последовательности гена *MBP-1* (macrophage binding protein), детерминирующего макрофагсвязывающийся белок обоих видов возбудителя кокцидиоидомикоза. По каналу ROX/Orange детектируется продукт амплификации фрагмента ДНК только одного возбудителя кокцидиоидомикоза *C. posadasii*, соответствующего гену *SOWgp82* (spherule outer wall glycoprotein), кодирующего иммунодоминантный гликопротеин внешней стенки сферул *C. posadasii*. По каналу Cy5/Red детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца).

Проведение анализа включает два этапа: 1). выделение ДНК из проб клинического и биологического материала, объектов окружающей среды 2). амплификация на приборах типа Rotor-Gene. Тип используемых зондов – «молекулярные маяки». Область «петли» зонда комплементарна анализируемому продукту ПЦР. В ходе реакции происходит гибридизация молекулярного маяка с ампликоном и расстояние между флуорофором и гасителем увеличивается, что приводит к повышению флуоресценции, которую фиксирует амплификатор. Учет результатов флуоресценции проводят по каждому каналу отдельно.

Ограничение метода. В инфицированном материале *C. immitis* и *C. posadasii* может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения нуклеиновых кислот на уровне не менее 20%. Ложноотрицательный результат

выявляется с помощью внутреннего контрольного образца (ВКО) (п. 7.4.4).

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения ДНК или на этапе проведения реакции ПЦР в режиме реального времени. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР-РВ (ОКВ и К-) (п. 7.4.4).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Аналитическая чувствительность.

Набор реагентов «Амплиген*Coccidioides*-РВ» должен выявлять и дифференцировать ДНК *C. immitis* и *C. posadasii* в суспензиях концентрацией не менее 1×10^4 кл./мл.

Аналитическая специфичность.

Набор реагентов «Амплиген*Coccidioides*-РВ» не должен давать положительных результатов с ДНК гетерологичных видов микроорганизмов в суспензиях концентрацией 1×10^7 кл./мл.

Диагностические характеристики.

Диагностические характеристики набора установлены в лабораторных условиях с применением 10 штаммов *C. immitis*, 15 штаммов *C. posadasii* и 20 штаммов гетерологичных микроорганизмов из лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора на модельных образцах материала: 176 проб суспензий возбудителей кокцидиоидомикоза *C. immitis* и *C. posadasii* в концентрации 1×10^4 кл./мл, 16 проб клинического материала, контаминированных возбудителями кокцидиоидомикоза *C. immitis* и *C. posadasii* в концентрации 1×10^4 кл./мл, 32 проб секционного материала, контаминированных возбудителями кокцидиоидомикоза *C. immitis* и *C. posadasii* в концентрации 1×10^4 кл./мл, 64 проб биологического материала, контаминированных возбудителями кокцидиоидомикоза *C. immitis* и *C. posadasii* в концентрации 1×10^4 кл./мл, 24 проб объектов окружающей среды, контаминированных возбудителями кокцидиоидомикоза *C. immitis* и *C. posadasii* в концентрации 1×10^4 кл./мл; 168 проб, контаминированных гетерологичными микромицетами и гетерологичными микроорганизмами (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida kruissi*, *Penicillium citreoviridae*, *Penicillium citrinum*, *Geotrichum immitis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) в концентрации 1×10^7 кл./мл (м.к./мл).

Определение возбудителей кокцидиоидомикоза *C. immitis*, *C. posadasii* и гетерологичных микроорганизмов подтверждено с использованием референтного метода – микробиологический (микологический) метод исследования микроорганизмов.

Диагностическая чувствительность - не менее 98,0 % с доверительной вероятностью 90% при анализе 312 положительных проб (176 проб суспензий микроорганизмов, 16 проб клинического материала, 32 пробы секционного материала, 64 пробы биологического материала, 24 пробы объектов окружающей среды), содержащих возбудителей кокцидиоидомикоза *C. immitis* и *C. posadasii* в концентрации 1×10^4 кл./мл получен положительный результат в 310 случаях.

Диагностическая специфичность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90%; при исследовании 168 отрицательных проб (100 проб суспензий микроорганизмов, 8 проб клинического материала, 16 проб секционного материала, 32 пробах биологического материала, 12 пробах объектов окружающей среды), содержащих гетерологичные микромицеты и гетерологичные микроорганизмы (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida kruissi*, *Penicillium citreoviridae*, *Penicillium citrinum*, *Geotrichum immitis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) в концентрации 1×10^7 кл./мл получен отрицательный ответ в 168 случаях.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

4.1 Информация об инфекционных или микробных рисках

Набор реагентов может быть использован в учреждениях, имеющих Лицензию на

деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, поэтому этапы подготовки образцов и проведение ПЦР-анализа проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.2 Необходимость обучения персонала

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности.

4.3 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.4 Информация об экологических рисках

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов, не прошедших контроль, а также серий с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.5 Информация о физических рисках, в том числе возможность взрыва или возгорания.

Набор реагентов следует применять по назначению в комбинации с приборами, прошедшими надлежащее техническое обслуживание. Необходимо строгое соблюдение инструкций по эксплуатации электрооборудования, безопасности при работе с электроприборами.

4.6 Информация о рисках применения, приводящих к ошибочному результату исследования:

- Использование набора реагентов «Амплиген*Coccidioides*-PB» с истекшим сроком годности;
- Нарушение условий транспортирования, хранения набора реагентов;
- Нарушения упаковки и внешнего вида компонентов набора реагентов;
- Нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- Нарушение условий окружающей среды при эксплуатации набора реагентов;
- Нарушение процесса проведения анализа, регистрации и учета результатов.
- Применение по назначению МИ в комбинации со средствами измерения, не прошедшими поверку и/или калибровку.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, необходимые при работе с изделием*:

Таблица 2

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа RotorGene	Амплификатор «RotorGene 6000» (Corbett Research, Австралия), «RotorGene Q», «Qiagen», Германия
Бокс биологической безопасности III класса	Бокс биологической безопасности III класса «БАВ - Ламинар-С» Protect mobile-1,8, «Ламинарные системы», Россия

ПЦР-бокс	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР- "Ламинар-С" «Ламинарные системы», Россия
Весы аналитические	«A&D DL-1200» Max 1220g d=0, 01g, напряжение 220 В, «A& D Company Limited», Япония
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-вортекс «Microspin FV-2400», НПФ ООО «BioSan», Латвия
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга на 13400 об/мин «MiniSpin» «Eppendorf», Германия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, «ТЕРМО 48», «Биоком», Россия.
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	Термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
pH-метр	pH-метр анализатор воды pH211 в комплекте с электродом HI 1131, HANNA Instruments, Румыния
Холодильник	«MPR-214F» рабочий диапазон температур - основная камера от +2 до +14 °С, морозильная камера -20-30 °С, 220В, 155 Вт, «Sanyo», Япония
Отсасыватель вакуумный медицинский с колбой-ловушкой	Отсасыватель медицинский «В-40», «Висма Планар» Беларусь
Дозатор 0,5 – 10 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 5 – 50 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 20 – 200 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 100 – 1000 мкл	ILS (CAPP), Дания
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
96-ти луночный алюминиевый штатив (для пробирок 0,2 мл)	«Corbett Research», Австралия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 5×10 мест с увеличенным расстоянием между лунками, «Интерлабсервис», Россия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,6 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,6 мл, 10×20 мест, «Хеликон», Россия
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки для ПЦР объемом 0,6 мл.	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США

Пестик для пробирок типа Eppendorf 1,5-2,0 мл	ФСЗ 2011/10287, «SSI», США
Ступка фарфоровая (№ 1)	ГОСТ 9147-80
Пестик фарфоровый (№ 1)	ГОСТ 9147-80
Порошок стеклянный марки ПС30	ГОСТ Р 52233-2004
Одежда одноразовая медицинская из нетканого и полимерного материалов	РЗН 2013/668
Перчатки медицинские диагностические одноразовые. Часть 1. Спецификация на перчатки из каучукового латекса или раствора	ГОСТ Р 52239-2004
Хлороформ	ГОСТ 20015-88
Спирт изопропиловый	ГОСТ 9805-84
Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья	ГОСТ 5962-2013
Фенол	ГОСТ 6417-72
Натрий уксуснокислый 3-водный, хч	ГОСТ 199-78
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233-77
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Перекись водорода	ГОСТ 177-88
Трис(гидроксиметил)аминометан TRISLAB	Свидетельство о государственной регистрации продукции № RU.77.99.32.008.E.003285.04.13 MerckKGaA, Германия
Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб - В»	ФСР 2009/05220, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «Рибо-сорб»	ФСР 2008/03993, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия

* Примечание: допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследования служат:

- пробы из суспензий выделенных культур возбудителей кокцидиомикоза или подозрительных изолятов;
- пробы клинического материала: пробы крови, мокроты,
- пробы секционного материала: биоптаты печени, селезенки, легкого,
- пробы биологического материала: суспензии сердца, печени, легкого, селезенки, почек, головного мозга, лимфатических узлов, кровь;
- пробы объектов окружающей среды: почвы, воздуха, смывов с поверхностей.

Каждый образец исследуемой пробы должен быть объемом не менее 0,5 мл.

Все пробы до проведения исследования должны храниться при температуре минус 18 °С.

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично завинчивающимися крышками в соответствии с требованиями СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036 – 95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». После проведения предварительной обработки проб допускается их

транспортировка при температуре от минус 16 до минус 20 °С в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

7.1. Подготовка исследуемых образцов.

7.1.1. Подготовка проб выделенных культур микромицетов

Исследуемые культуры микроскопических грибов, подозрительные на возбудителей кокцидиоидомикоза, суспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, рН (7,2±0,1), в микропробирке объемом 1,5 мл. Из чистых культур возбудителей кокцидиоидомикоза готовят суспензии в 2 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида, рН (7,2±0,1) по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует концентрации 1×10^7 кл/мл *C. immitis*, *C. posadasii*. Затем проводят 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^4 кл./мл. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают суспензии клеток чистой культуры в количестве 1 мл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

7.1.2. Подготовка проб клинического (биологического) материала

Кровь

Кровь у людей берут из локтевой вены в объеме 1 мл и для предотвращения свертывания сразу добавляют 6 % раствор ЭДТА в соотношении 1:20 или с помощью одноразовой иглы (диаметр 0,8-1,1 мм) и специальной вакуумной системы типа «Vacuett» с ЭДТА или цитратом натрия, или стерильным шприцем в стерильные стеклянные или пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом. После центрифугирования отбирают лейкоцитарное кольцо вместе с плазмой. Хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 сут при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 месяца, при температуре не выше минус 68 °С – в течение 1 года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. При замораживании клинического материала его транспортировка должна проводиться также в замороженном состоянии. Для исследования в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл отбирают пробу в количестве 100 мкл. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Мокрота

Мокроту забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и закручивающимися крышками объемом не менее 50 мл. Для разжижения мокроты применяют либо приготовленную ex tempore смесь NALC (N-ацетил-L-цистеина 0,25 г, 25 мл 4 % раствора NaOH, 25 мл 0,1 М тризамещенного натрия цитрата), либо раствор «Муколизин» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) (Na_2HPO_4 0,0774 М, NaH_2PO_4 0,0226 М, бетаМЭ 0,094 М, 5 % азид натрия в конечной концентрации 0,05 %). Пробу объемом 1-2 мл смешивают либо с равным объемом смеси NALC, либо с пятикратным объемом раствора «Муколизин». Пробы со смесью NALC перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 15 мин, периодически встряхивая. Затем разводят 0,067 М фосфатным буфером (рН 6,8) до конечного объема 50 мл. Пробу центрифугируют в течение 10 мин при 9000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробы с раствором «Муколизин» перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 20-30 мин, периодически встряхивая. Затем отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с закручивающейся крышкой и центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Секционный материал (биоптаты печени, селезенки, легкого) отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Для растирания кусочков органов используют либо стерильную ступку со стеклянным порошком либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной ступке со стеклянным порошком кусочки органов массой до 10 г

растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися крышками, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов массой 0,1-1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Пробы органов лабораторных и диких животных

Органы лабораторных и диких животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки органов (сердце, печень, легкие, селезенка, почки, головной мозг), лимфотические узлы растирают с использованием либо стерильной ступки со стеклянным порошком либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной ступке со стеклянным порошком кусочки органов (сердце, печень, легкие, селезенка, почки, головной мозг) массой до 10 г, лимфотические узлы целиком растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися крышками, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов и лимфотические узлы массой 0,1-1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

7.1.3. Подготовка проб из объектов окружающей среды

Почва

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин при 5000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Воздух

Пробы воздуха отбирают с помощью специальных приборов (импакторов или импинжеров), снаряженных сорбирующей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 3-5 м³.

После окончания отбора пробы воздуха фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный флакон (чашку Петри) или стерильный пластиковый пакет типа «Вихрь» объемом 100 мл, содержащих 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Для десорбции микроорганизмов с фильтра флакон встряхивают в течение 10 мин с помощью шейкера, фильтр внутри пакета типа «Вихрь» растирают вручную в течение 1 мин, фильтр, помещенный в чашку Петри, разрезают на мелкие куски ножницами и инкубируют при

покачивании в течение 10 мин. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку.

Для исследования методом ПЦР отбирают 1 мл в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Для выявления микромицетов оставляют 0,1 мл надосадочной жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Смывы с поверхности

Для взятия смывов используют отдельные стерильные зонды с ватными тампонами, которые смачивают в 0,9 %-ном растворе натрия хлористого и вращательными движениями протирают поверхность размером 10x10 см в течение 10-15 секунд. Затем зонды помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с 1000 мкл 0,9 %-ного раствора натрия хлористого, где, избегая разбрызгивания раствора, их вращают в течение 10-15 секунд, отжимают о стенку пробирки и удаляют в дезраствор. Пробы центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (пп. 7.2, 7.3).

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение суток при температуре от 2 °С до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Для аутопсийного материала предусмотрены следующие режимы хранения: ткани внутренних органов хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре минус 70 °С.

7.2. Обеззараживание материала

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Дополнительно к исследуемым образцам готовят отрицательный контроль выделения (ОКВ). Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ТЕ-буфера.

К исследуемым образцам и ОКВ добавляют раствор мертиолата натрия до конечной концентрации 0,1 мг/мл (1:1000) с последующим прогреванием на водяной бане 40 мин при 56 ± 1 °С и инкубацией при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем к 100 мкл исследуемого образца добавляют 600 мкл лизирующего раствора (300 мкл лизирующего раствора, содержащего 6М гуанидинизотиоционата натрия и 300 мкл фенола, забуференного Трис-HCl, pH 8,0), перемешивают и прогревают при температуре (95 ± 1) °С в течение 30 мин.

При исследовании чистых культур после инкубирования с раствором мертиолата натрия 1 мл подготовленной суспензии микромицетов центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, а затем добавляют лизирующий раствор.

После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

7.3. Выделение ДНК

7.3.1. Выделение ДНК из суспензий культур микромицетов, проб мокроты, воздуха и смывов с поверхности осуществляют методом гуанидинизотиоцианат-фенольной экстракции с переосаждением ДНК спиртом изопропиловым

После этапа обеззараживания и лизиса в пробирку добавляют 60 мкл 3 Моль раствора натрия уксуснокислого, 3-водного. Перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе, центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 с. Добавляют 300 мкл хлороформа, тщательно перемешивают и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 5 мин. В отдельную микропробирку объемом 1,5 мл осторожно отбирают верхнюю фазу раствора, содержащую ДНК. Добавляют 600 мкл спирта изопропилового для переосаждения ДНК, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и инкубируют при температуре минус (20 ± 1) °С в течение 1 ч. Затем центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин, осторожно удаляют супернатант. Добавляют 500 мкл 70% раствора спирта этилового,

перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осторожно удаляют супернатант и добавляют 500 мкл 95% спирта этилового. Перемешивают содержимое пробирки на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют в течение 5 мин при 12000 об/мин. Осторожно удаляют супернатант, осадок (ДНК) подсушивают при температуре $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 5 мин, затем для растворения ДНК добавляют 100 мкл ТЕ-буфера и инкубируют $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 10 мин.

7.3.2. Выделение ДНК из проб крови, секционного материала, органов лабораторных и диких животных, почвы осуществляют методом гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с нуклеосорбцией на силикагеле

После этапа обеззараживания и лизиса в пробирку добавляют 60 мкл 3 Моль раствора натрия уксуснокислого, 3-водного. Перемешивают на микроцентрифуге/ встряхивателе, центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 с. Затем в пробирку добавляют 300 мкл хлороформа. Перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют в течение 5 мин при 12000 об/мин. В новую пробирку отбирают верхнюю фазу, содержащую ДНК, и добавляют 400 мкл хлороформа. Перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют в течение 5 мин при 12000 об/мин. Повторяют обработку хлороформом.

Затем в новую пробирку отбирают верхнюю фазу, содержащую ДНК, в которую отдельным наконечником добавляют по 25 мкл ресуспендированного сорбента и в зависимости от вида пробы проводят выделение ДНК: из проб крови, почвы - методом **нуклеосорбции на силикагеле** с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия); из проб биологического материала - «Рибо-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанным наборам.

7.4. Проведение ПЦР – амплификации ДНК

7.4.1. Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР

Из морозильной камеры извлекают ПЦР-смесь-1 *Coccidioides*, ПЦР-буфер-2, MgCl_2 , ТЕ-буфер, ВКО и ПКО ДНК *Coccidioides* и размораживают при комнатной температуре. Taq-F-ДНК-полимеразу извлекают и держат на холоде. Перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки.

Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с аэрозольным барьером с помощью дозаторов переменного объема.

Для проведения реакции отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл, соответствующее числу исследуемых проб, ОКВ, отрицательного (К-) и положительного (К+) контролей амплификации. Пробирки для «Rotor-Gene» подписывают сверху.

В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовят реакционную смесь из расчета, что на 1 реакцию необходимо:

- ПЦР-смесь-1 *Coccidioides* – 6 мкл,
- ПЦР-буфер-2 – 5 мкл,
- MgCl_2 – 3 мкл,
- ВКО – 1,5 мкл,
- TaqF-ДНК-полимераза – 0,4 мкл

Подготовленные смеси тщательно перемешивают путем пипетирования или на микроцентрифуге/встряхивателе и раскапывают в соответствующие пробирки по 15 мкл.

Затем в пробирки вносят по 10 мкл исследуемых ДНК-проб и 3 контрольных:

- а) отрицательный контроль экстракции (ОКВ) – вместо ДНК-пробы вносят 10 мкл образца, выделенного из пробы отрицательного контроля экстракции.
- б) отрицательный контроль ПЦР (К-) – вместо ДНК-пробы вносят 10 мкл ТЕ-буфера.
- в) положительный контроль ПКО ДНК *Coccidioides* (К+) – вместо ДНК-пробы вносят 10 мкл образца положительного контроля ДНК *C. posadasii*.

Общий объем реакции – 25 мкл, включая объем ДНК-пробы – 10 мкл.

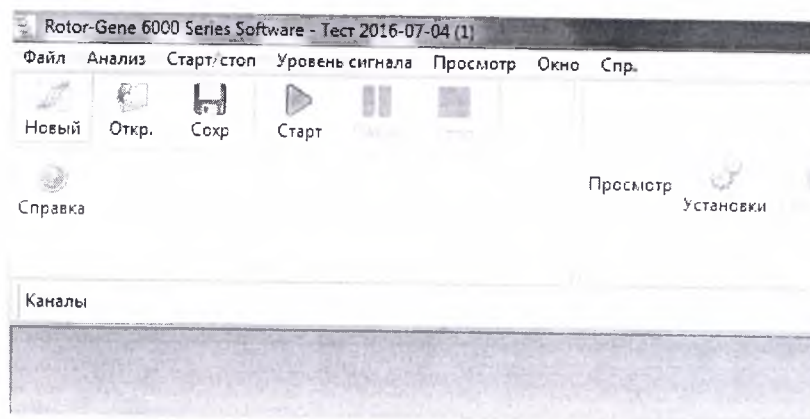
7.4.2 Проведение термоциклирования

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер типа RotorGene

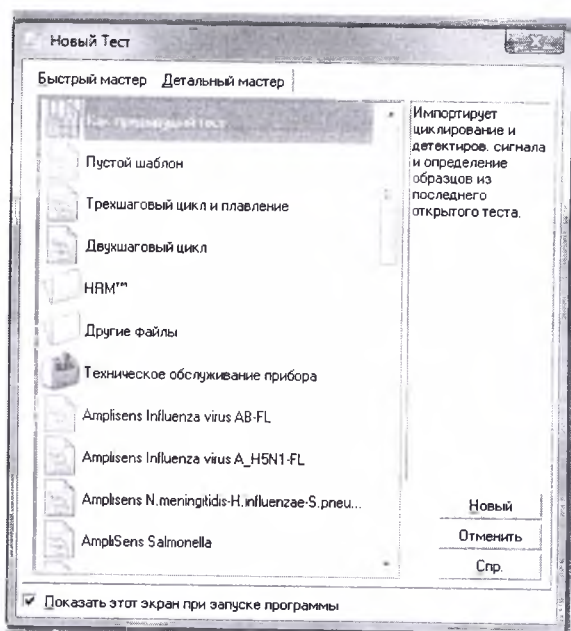
Программирование амплификатора типа RotorGene:

Для работы с прибором прибором «Rotor-Gene» 6000 и «RotorGene» Q следует использовать программу “Rotor-Gene 6000” версии 1.7 (build 67) или выше. При описании программы термины для каждой версии программы представлены следующим образом: для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажимают кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.

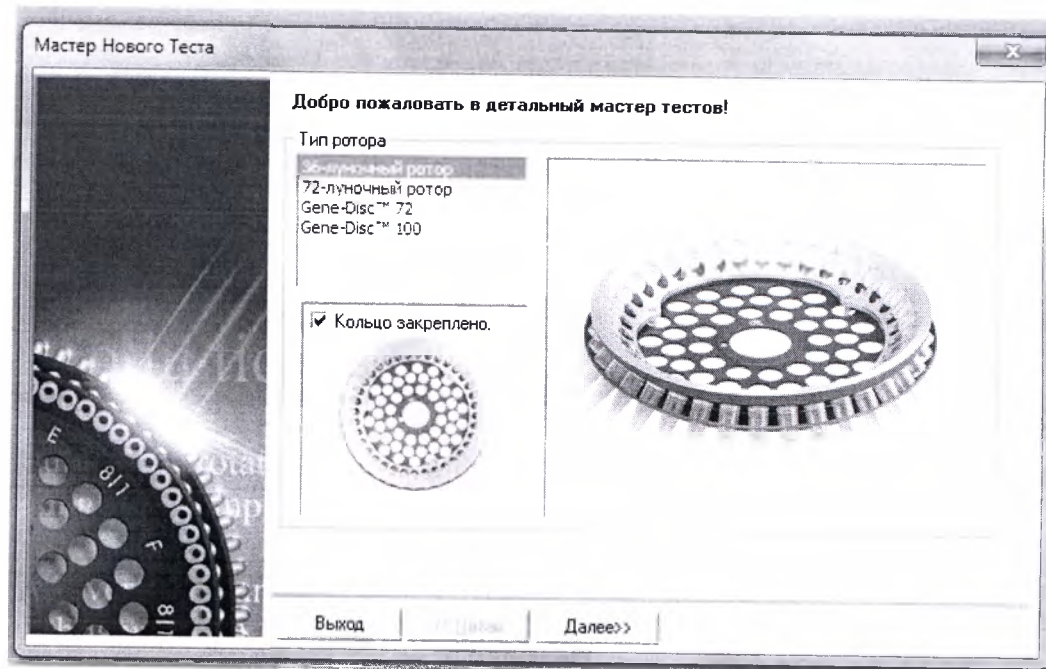


2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер» Нажимают кнопку «New»/«Новый».

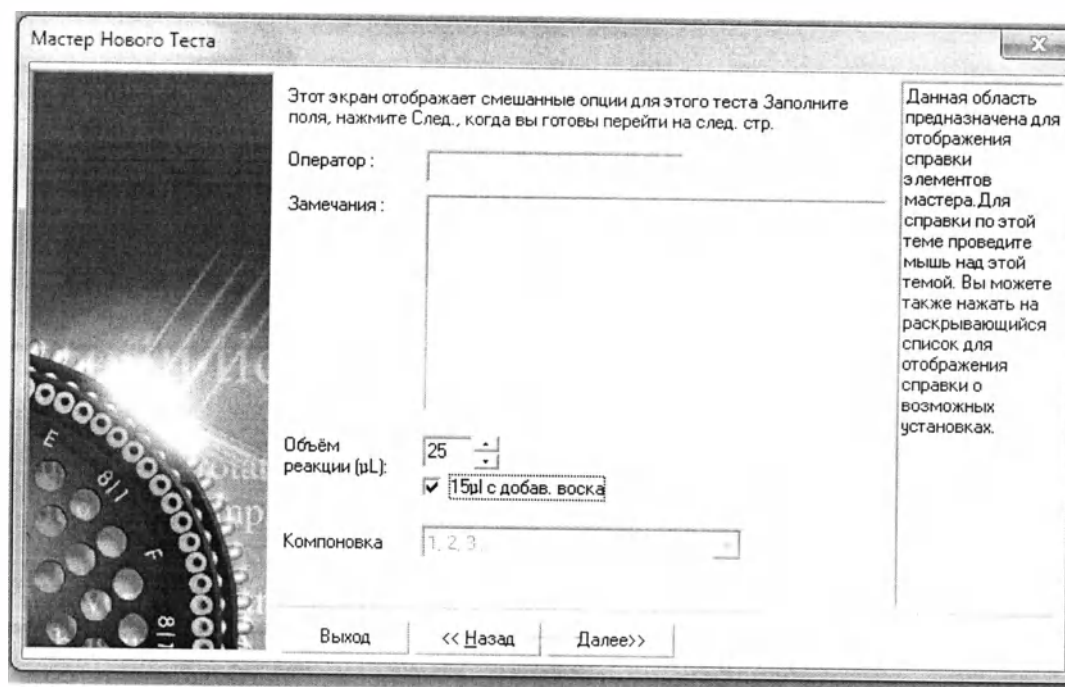


3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».

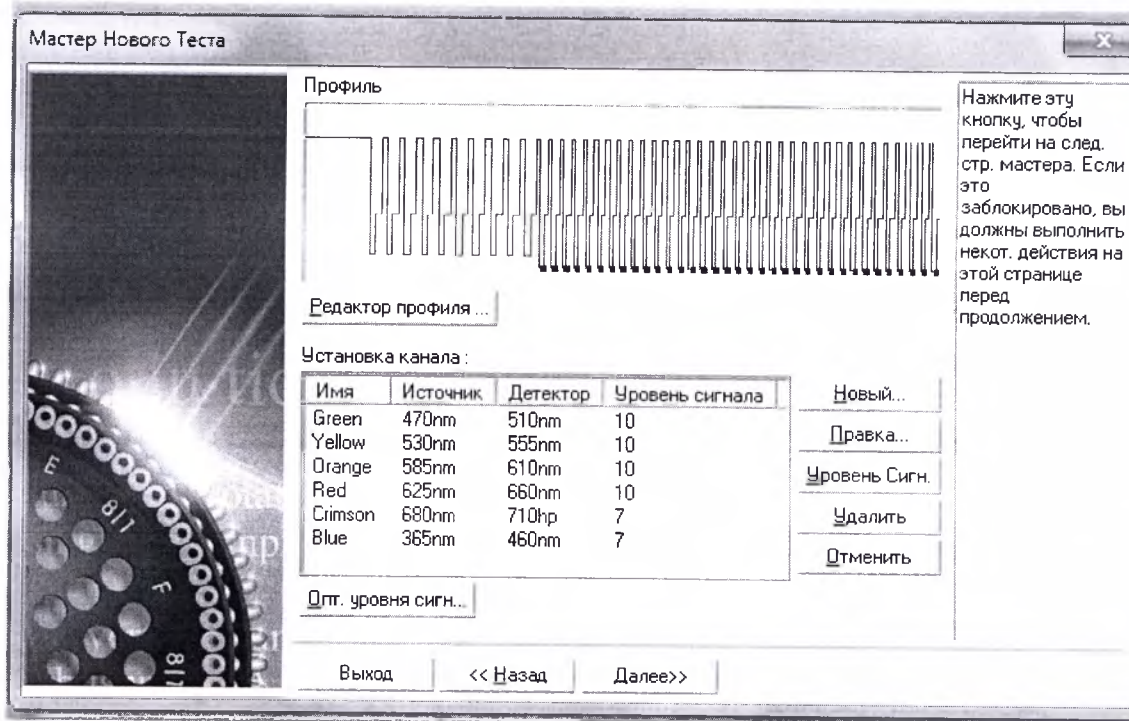
4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



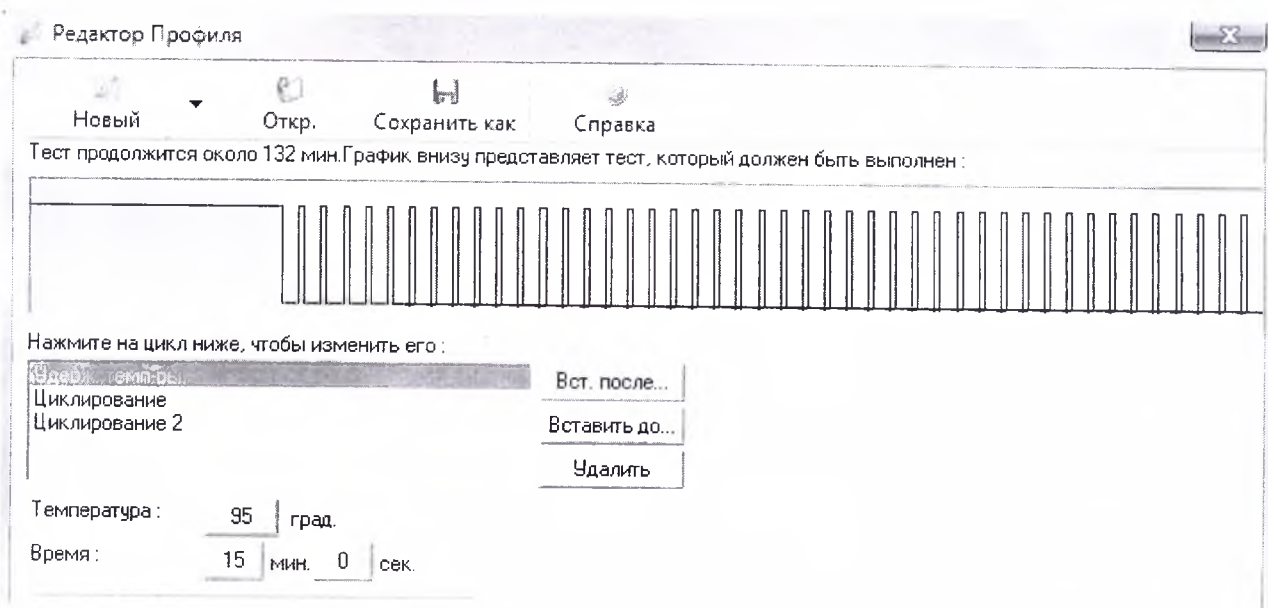
5. Выбирают объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 μ l oil layer volume»/«15 μ L объем масла/воска».



6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».



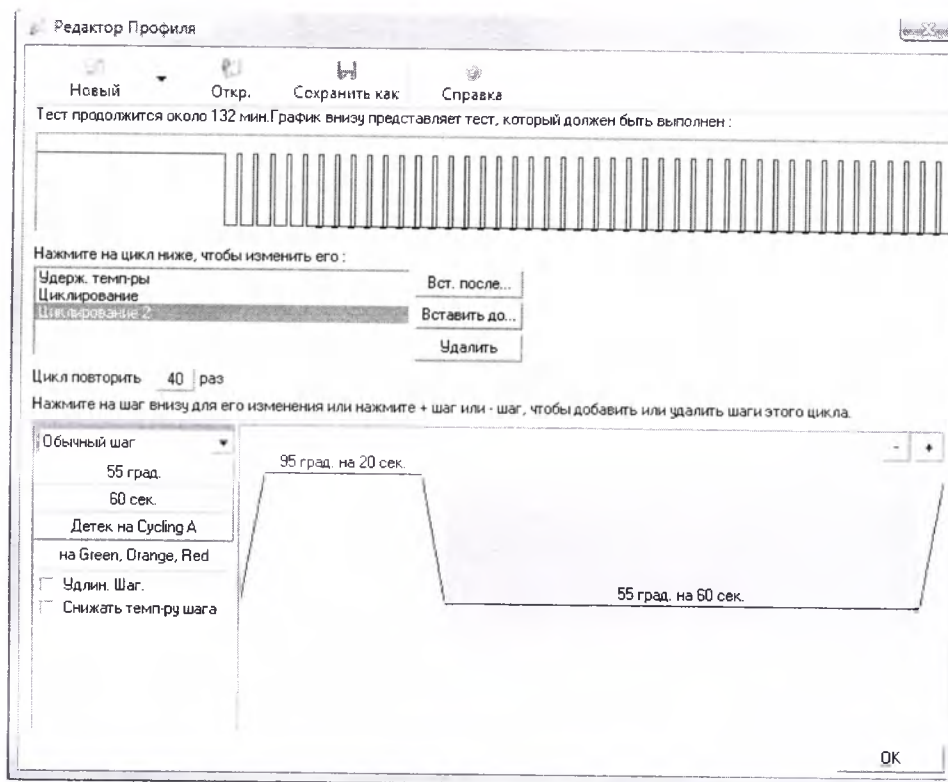
8. Задают следующие параметры эксперимента:

Таблица 3

Программа амплификации для «АмплигенCoccidioides-PB»

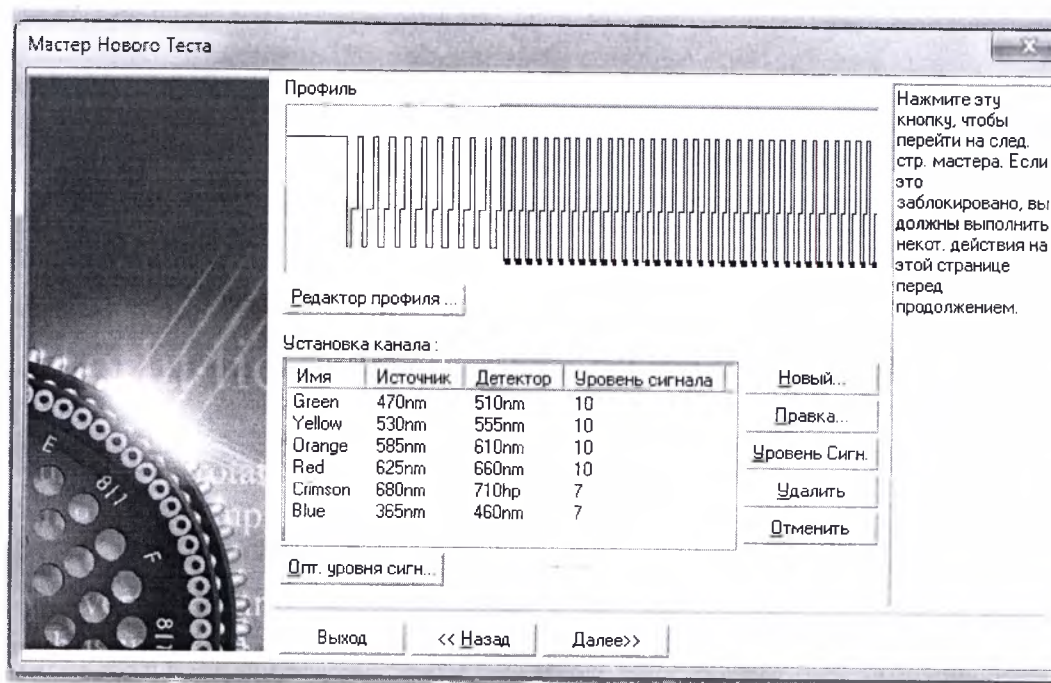
Номер этапа	Температура, °C	Время экспозиции	Кол-во циклов
1	95,0	15 мин	1
2	95,0	20 с	5
	55,0	60 с	
3	95,0	20 с	40
	55,0*	60 с детекция флуоресц. сигнала*	
4	10,0	Режим хранения	

*Примечание: детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green, ROX/Orange и Cy5/Red на втором этапе циклирования.

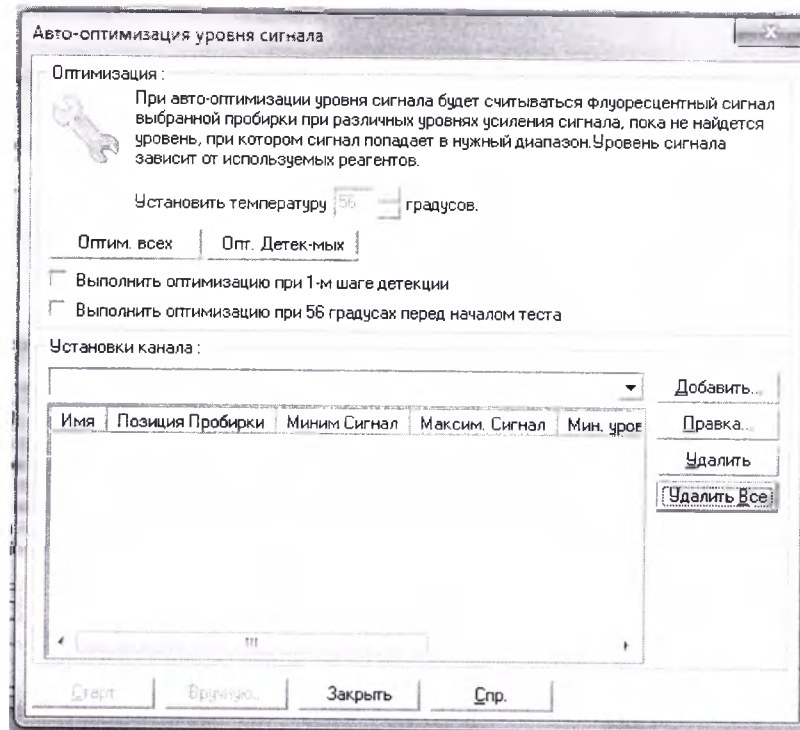


Нажимают кнопку «ОК»/«Да».

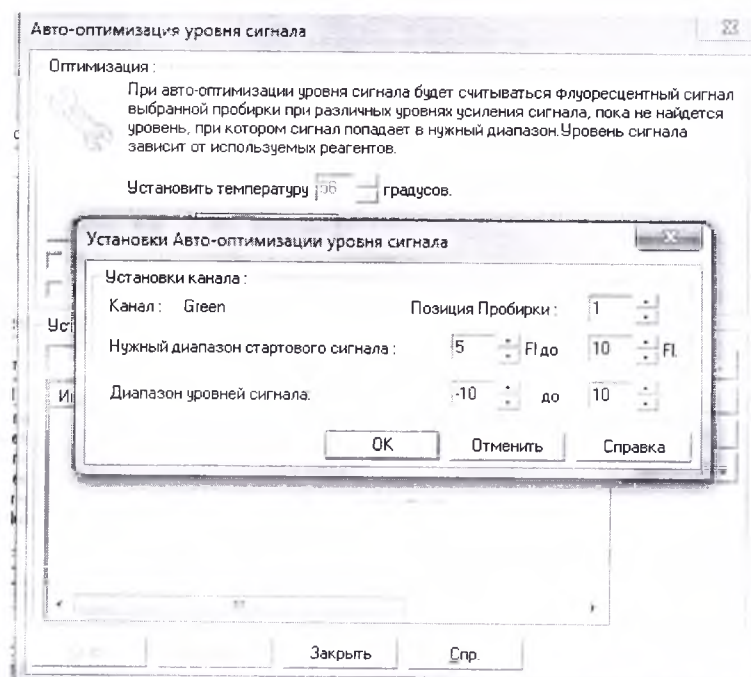
9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.».



В открывшемся окне нажимают кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых».

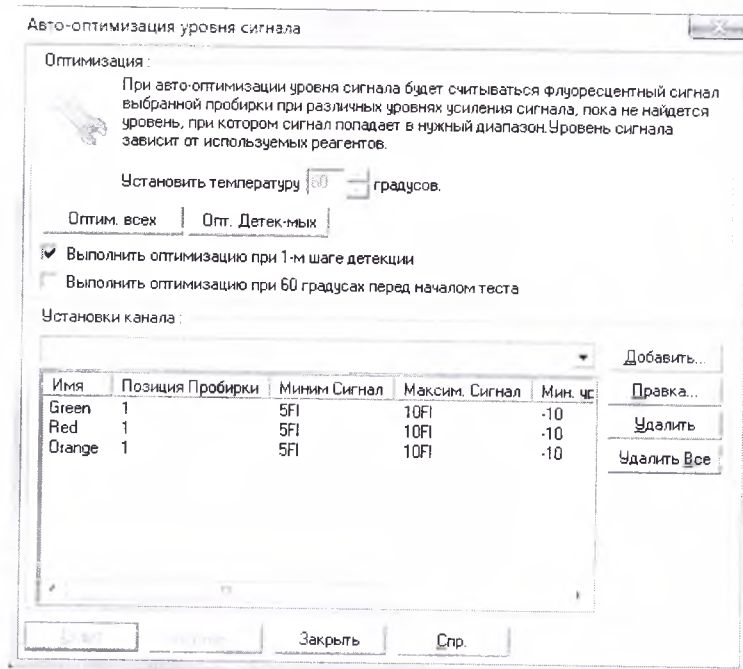


- для красителя **FAM/Green** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10**,
- для красителя **ROX/Orange** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10**,
- для красителя **Cy5/Red** указывают в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5**, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10**.

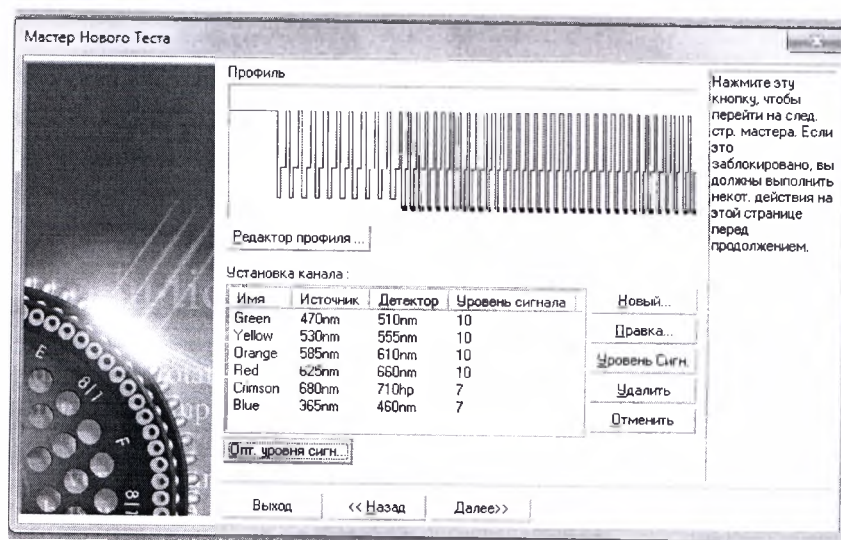


В графе *Tube position/Позиция Пробирки* указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с какой-либо исследуемой пробиркой с реакционной смесью.

Помечают галочкой бокс в строке «*Perform Calibration Before 1st Acquisition*»/«*Perform Optimisation Before 1st Acquisition*»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывают окно *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала*, нажимают кнопку «Close»/«Закреть».



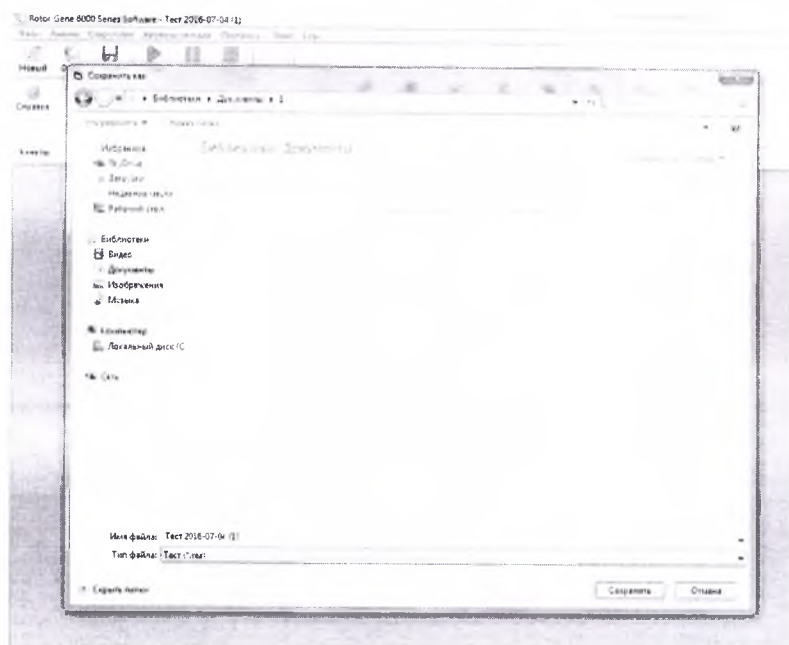
Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт». При необходимости введенные значения термоциклирования могут быть сохранены в качестве шаблона, используя кнопку «Save template/ «Сохр. шаблон».



11. Дают название эксперименту и сохраняют его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).



В процессе работы амплификатора или по окончании его работы программируют положение пробирок в карусели. Для этого используют кнопку «Edit samples»/«Правка образцов» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначают меню Samples/Образцы как Unknown/Неизвестный.

7.4.3. Анализ и учет результатов

Регистрация результатов на приборах типа RotorGene

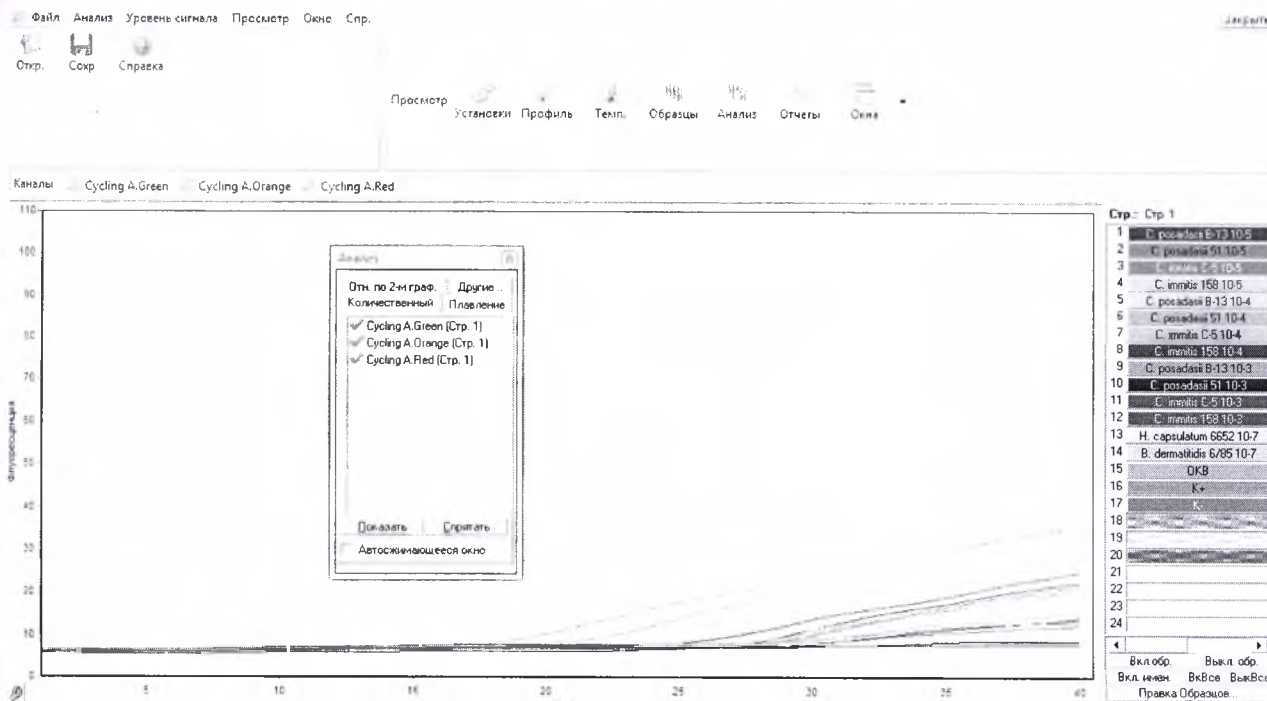
Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Для регистрации результатов амплификации на приборах типа Rotor Gene используют следующие показатели (Таблица 4).

Таблица 4

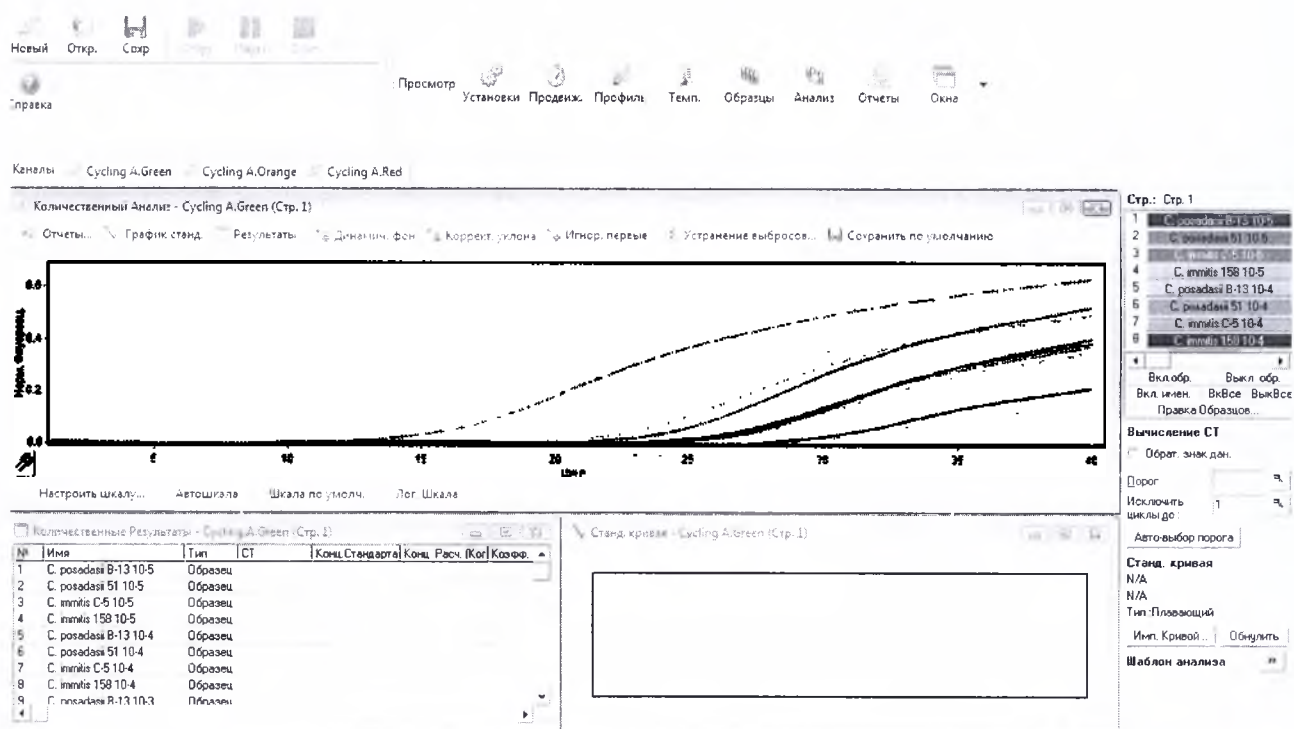
Показатели	FAM	ROX	Cy5
Наименование мишени	ДНК <i>C. immitis</i> <i>C. posadasii</i>	ДНК <i>C. posadasii</i>	ДНК ВКО
Функция «DynamicTube/Динамич. Фон»	активна	активна	активна
Функция «Slope Correct»/«Коррек. уклона»	активна	активна	активна
Функция «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов»	10 %	10 %	10 %
Значения Threshold/Порог	0,03	0,03	0,03

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green:

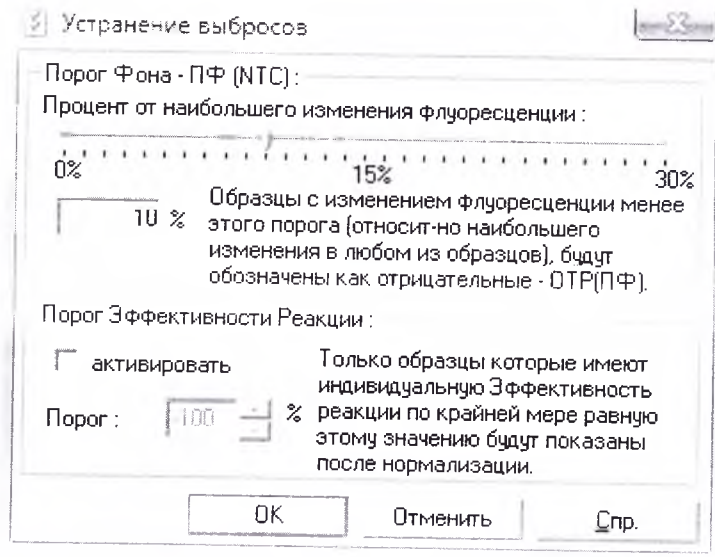
1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», нажимают кнопку «Show»/«Показать».



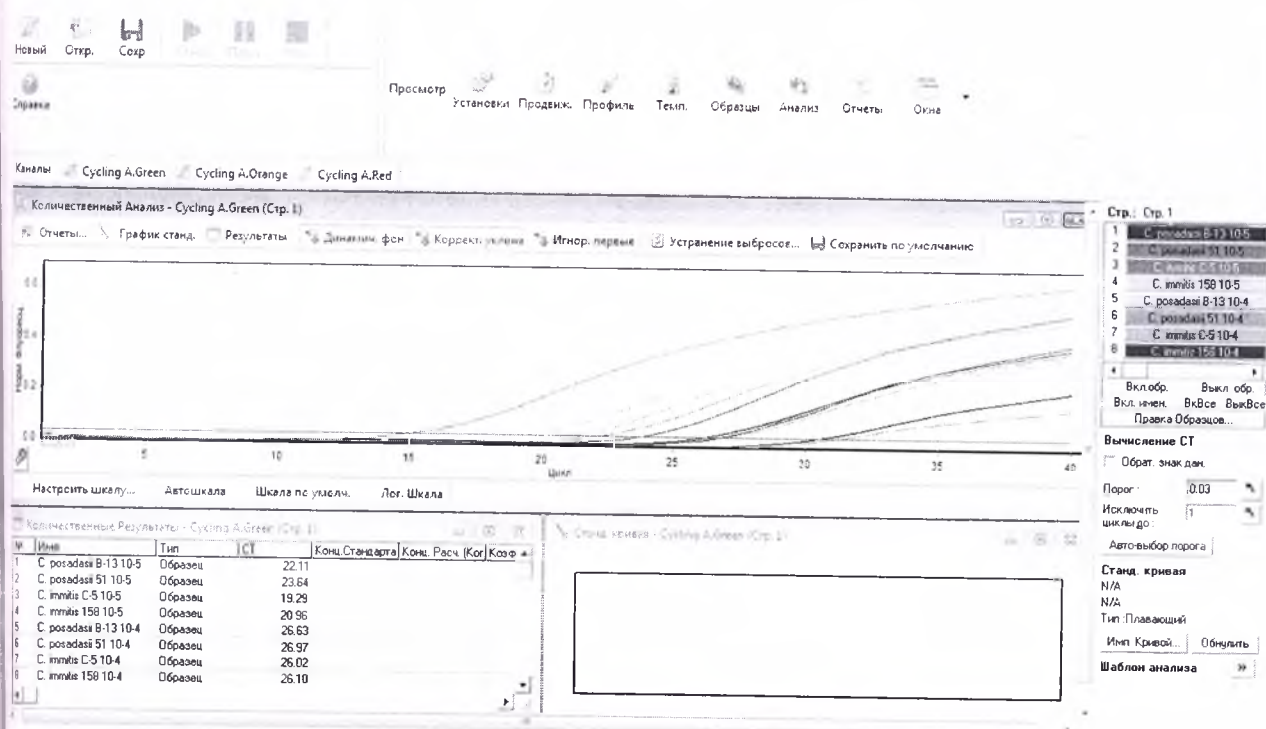
- Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
- В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
- Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).



- В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.



6. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,03.



7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. ROX»/«Cycling A. Orange»; нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.

6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу Cy5/Red:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. Cy5»/«Cycling A. Red», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор Threshold/Порог.
3. В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Пример регистрации и учета результатов на приборе типа Rotor Gene представлен в приложении 1.

7.4.4. Учет результатов на приборах типа RotorGene

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Вносят значения Ct полученные по каждому из каналов в бланк (приложение 2) и проводят учет и интерпретацию результатов в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительного, отрицательного контролей и отрицательного контроля выделения и таблица интерпретации данных анализа на приборах типа RotorGene.

К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительного (K+), отрицательного (K-) контролей амплификации и ОКВ (табл. 5).

Для приборов типа RotorGene пороговое значение Ct для положительных проб по каналам FAM, ROX составляет не более 33 (табл. 6).

Образец считается положительным и содержит ДНК *C. immitis*, если в таблице результатов (пороговых циклов) по каналу FAM/Green для него определено значение порогового цикла $Ct < 33$, отсутствует значение Ct на канале ROX/Orange и по каналу Cy5/Red значение определено или отсутствует;

Образец считается положительным и содержит ДНК *C. posadasii*, если в таблице результатов (пороговых циклов) по каналу FAM/Green значение $Ct < 33$ или отсутствует, по каналу ROX/Orange для него определено значение порогового цикла $Ct < 33$, и по каналу Cy5/Red значение определено или отсутствует;

Образец считается отрицательным, если в таблице результатов (пороговых циклов) по каналу FAM/Green и по каналу ROX/Orange для него не определено значение (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу Cy5/Red для него определено значение Ct, не превышающее 33.

Образцы, для которых отсутствует значение Ct как по каналам FAM/Green и ROX/Orange, так и по каналу Cy5/Red, или по каналу Cy5/Red получено значение Ct более 33, то результат анализа считают невалидным. Необходимо повторное проведение ПЦР и детекции. При отсутствии повышения значений Ct по каналу Cy5/Red результат считают отрицательным. В случае повторного отсутствия Ct или его значения более 33, требуется повторить анализ

образца, начиная с этапа выделения.

Таблица 5

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу			Результат
		FAM/Green	ROX/Orange	Cy5/Red	
		Детекция <i>C. immitis</i> <i>C. posadasii</i>	Детекция <i>C. posadasii</i>	Детекция ВКО	
К (+)	ПЦР	< 33	< 33	< 33	положительный
К (-)	ПЦР	—	—	< 33	отрицательный
ОКВ	Выделение ДНК	—	—	< 33	отрицательный

Таблица 6

Таблица интерпретации данных анализа на приборах типа RotorGene

Проба	Значение порогового цикла (Ct) по каналу			Результат анализа / вид возбудителя в пробе
	FAM/Green	ROX/Orange	Cy5/Red	
	ДНК <i>C. immitis</i> <i>C. posadasii</i>	ДНК <i>C. posadasii</i>	ДНК ВКО	
Исследуемые пробы	—/ < 33	< 33	определено или отсутствует	Положительный/обнаружена ДНК <i>C. posadasii</i>
	< 33	—	определено или отсутствует	Положительный/обнаружена ДНК <i>C. immitis</i>
	—	—	< 33	Отрицательный/не обнаружена ДНК штаммов <i>C. immitis</i> и <i>C. posadasii</i>
	При значении Ct по одному или нескольким каналам			
	>33	>33	отсутствует или >33	Результат невалидный. Необходимо повторить исследование
	—	—	отсутствует или >33	Результат невалидный. Необходимо повторить исследование

Пример интерпретации результатов анализа на приборе типа Rotor Gene представлены в приложении 1.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 21.20.23-012-01898084-2016 условия хранения компонентов набора реагентов «Амплиген *Coccidioides*-PB»: ПЦР-смесь-1 *Coccidioides*, ПЦР-буфер-2, MgCl₂, Taq-F-ДНК-полимераза, ВКО, ПКД ДНК *Coccidioides*, ТЕ-буфер – при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С. ПЦР-смесь-1 *Coccidioides* хранить в защищенном от света месте.

8.2. Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Амплиген *Coccidioides*-PB» осуществляют всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями ГОСТ 15150 и правилами, установленными для каждого вида транспорта. Условия транспортирования – при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С – неограниченно.

8.3. Срок годности набора

Срок годности набора реагентов «Амплиген*Coccidioides*-РВ» - 9 месяцев.
Срок годности ПКО ДНК *Coccidioides* - 9 месяцев при хранении при температуре от минус 16 до минус 20 °С.

Условия эксплуатации набора реагентов «Амплиген*Coccidioides*-РВ» – при температуре от 18 до 25 °С.

8.4. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Амплиген*Coccidioides*-РВ» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

Производитель – Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) (400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел. (8442) 37-37-74).

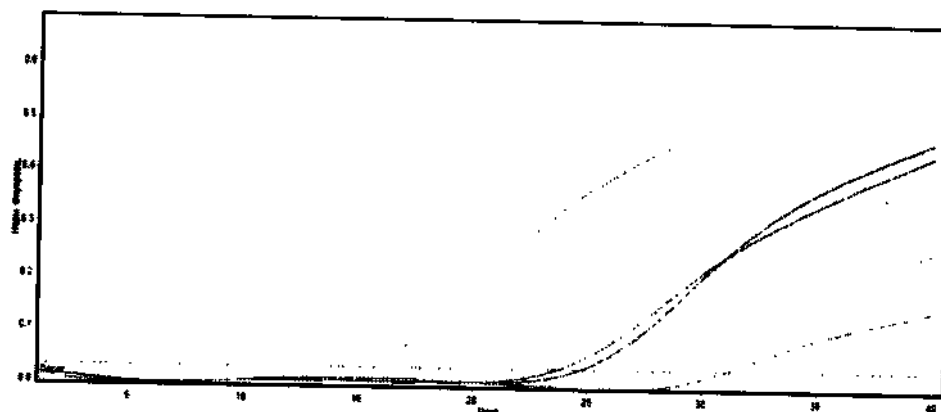
Директор ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора академик РАН, д.м.н., профессор



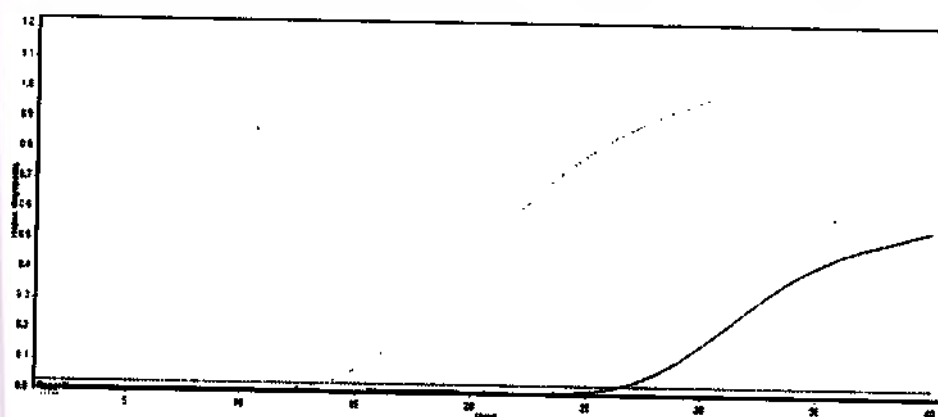
В.В. Кутырев

Пример регистрации, учета и интерпретации результатов с использованием набора реагентов
«Амплиген*Coccidioides*-PB»

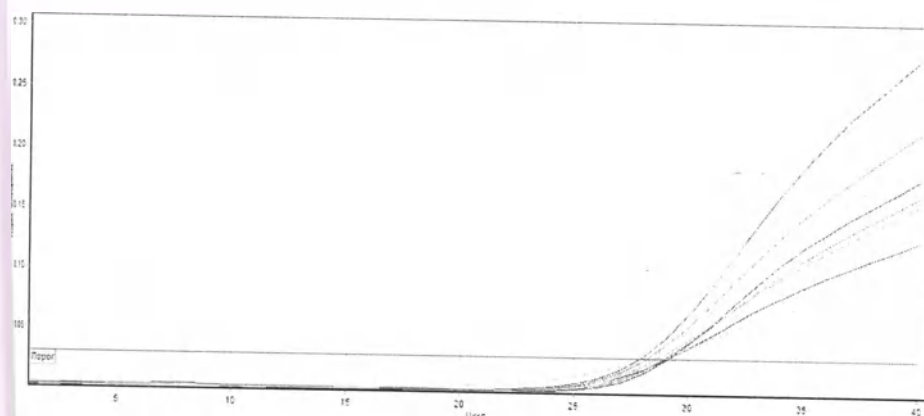
FAM



ROX



Cy5



Проба	Значения порогового цикла (Ct) по каналу			Интерпретация результата
	FAM/ Green	ROX/ Orange	Cy5/ Red	
	ДНК <i>C. immitis</i> <i>C. posadasii</i>	ДНК <i>C. posadasii</i>	ДНК ВКО	
1.	24,69	23,55	29,09	Положительный/ обнаружена ДНК <i>C. posadasii</i>
2.	28,25	26,52	29,04	Положительный/ обнаружена ДНК <i>C. posadasii</i>
3.	—	—	27,85	Отрицательный/ не обнаружена ДНК штаммов <i>C. immitis</i> и <i>C. posadasii</i>
4.	23,72	—	28,96	Положительный/ обнаружена ДНК <i>C. immitis</i>
5.	26,63	—	28,13	Положительный/ обнаружена ДНК <i>C. immitis</i>
6.	31,04	—	28,26	Положительный/ обнаружена ДНК <i>C. immitis</i>
7.	—	—	27,75	Отрицательный/ не обнаружена ДНК штаммов <i>C. immitis</i> и <i>C. posadasii</i>
8.	—	—	28,02	Отрицательный/ не обнаружена ДНК штаммов <i>C. immitis</i> и <i>C. posadasii</i>
К+	15,26	14,96	31,09	☐ - результаты подлежат учету
К-	—	—	28,02	☐ - результаты подлежат учету
ОКВ	—	—	27,85	☐ - результаты подлежат учету

Бланк учета результатов с использованием набора реагентов
«Амплиген *Coccidioides*-PB»

Проба	Значения порогового цикла (Ct) по каналу			Интерпретация результата
	FAM/Green	ROX/Orange	Cy5/Red	
	ДНК <i>C. immitis</i> <i>C. posadasii</i>	ДНК <i>C. posadasii</i>	ДНК ВКО	
1				
2				
3				
4				
5				
K+				☐ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету
K-				☐ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету
OKB				☐ - результаты подлежат учету ☐ - результаты не подлежат учету

Прошито и пронумеровано

