

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 20 г. № _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ
Роспотребнадзора

Топорков А.В.

20/5т.

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ДНК МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *HISTOPLASMA* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ
«АМПЛИГЕНГИСТО-РВ» ПО ТУ 9398-010-01898084-2013**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК микромицетов рода *Histoplasma* методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «АмплигенГисто-РВ» предназначен для обнаружения ДНК возбудителей гистоплазмоза *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, *H. capsulatum* var. *farcinosum* в пробах выделенных культур, биологического материала и из объектов окружающей среды методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. 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.

3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

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. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод полимеразной цепной реакции – ПЦР представляет собой повторяющиеся циклы синтеза – амплификации специфической области ДНК-мишени в присутствии Taq-полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень. Детекция результатов осуществляется путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ПЦР в режиме реального времени. По каналу ROX/Orange детектируется продукт амплификации фрагмента гена MS8 (mold-specific MS8 protein), кодирующего белок *Histoplasma capsulatum*. По каналу Cy5/Red детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца).

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

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

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
ПЦР-смесь-1 <i>H.capsulatum</i>	смесь праймеров, зондов, дНТФ – прозрачная бесцветная жидкость	0,35	1 пробирка
ПЦР-буфер-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Taq-F-ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой фермент с активностью 5 ед/мкл	0,025	1 пробирка
p-p MgCl ₂	прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 25 мМ водный раствор магния хлорида	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК <i>H.capsulatum</i>	препарат ДНК <i>H.capsulatum</i> var. <i>capsulatum</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 «АмплигенГисто-РВ» рассчитан на проведение 50 определений, включая положительные и отрицательные контроли.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ*:

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа RotorGene	Амплификатор «RotorGene 6000», «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
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-встряхиватель «ТЭТА-2», «Биоком», Россия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, Термо 24-15, «Биоком», Россия.
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга на 13400 об/мин «MiniSpin» «Eppendorf», Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский «ОМ-1» ОАО «Утес», Россия
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	Термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
Дозатор 0,5 – 10 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 10 – 100 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

Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,2 мл, 10×20 мест, «Интерлабсервис», Россия
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
Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 18°С	«Атлант», Россия
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объемом с аэрозольным барьером до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
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, хч	ТУ 6-09-4263-76
Изопропиловый спирт, хч	ТУ 6-09-402-85
Спирт этиловый	ФС 42-3072-00
«Chitinase from <i>Trichoderma viride</i> »	«Sigma-ALDRICH», Германия
Фенол, чда	ГОСТ 6417-72
Натрий уксуснокислый 3-водный, хч	ГОСТ 199-78
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233-77
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Трис-(оксиметил)-аминометан, хч	ТУ 6-09-4292-76
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328-77
Магний хлористый, 6-водный	ГОСТ 4209-77

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

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 «Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов» при температуре не выше минус 16°С. ПЦР – смесь-1 *H.capsulatum* хранить в защищенном от света месте. Срок годности набора при хранении компонентов набора при температуре не выше минус 16 °С в течение 9 мес.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов «АмплигенГисто-РВ» с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ПЦР-анализ выполняется в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и МУ 1.3.2569 -09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер.

Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом.

Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их с одного рабочего места на другое.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат: суспензии культур возбудителя гистоплазмоза или подозрительных изолятов; пробы крови, мокроты; суспензий органов (печень, селезенка, легкие) человека и мелких млекопитающих, образцы почвы, смывов с поверхности, пробы воды открытых водоемов, погадки летучих мышей или птиц. Каждый образец исследуемой пробы должен быть объемом не менее 0,5 мл. Все пробы до проведения исследования должны храниться при температуре минус 18°C.

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично закрывающимися 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 °C 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 °C в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

9.1. Подготовка проб чистых культур микроорганизмов для ПЦР

Исследуемые культуры грибов в мицелиальной фазе роста культивируют на агаре Сабуро при 28 °C в течение 30 суток. Дрожжевые формы *H.capsulatum* выращивают на ФТ-агаре с добавлением цельной крови и L-цистеина при 37 °C в течение 10-14 суток, в зависимости от штамма. Из выросших культур готовят суспензии в 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида, pH 7,2±0,1.

Затем взвеси микромицетов обеззараживают добавлением раствора мертиолята натрия до конечной концентрации 0,1 мг/мл (1:1000) с последующим прогреванием на водяной бане 40 мин при 56±1 °C и инкубацией при комнатной температуре в течение 24 ч.

После обеззараживания и фильтрования суспензий грибов, проводят подсчет клеток исходных взвесей артроспор и дрожжевой фазы микромицетов в камере Горяева. Подсчет клеток необходимо проводить из нескольких разведений (суспензии грибов титруют с шагом разведений в 5 раз). Затем взвеси микромицетов разводят 0,9 %

раствором хлорида натрия таким образом, чтобы концентрация составляла 1×10^4 м.к./мл. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл переносят 1 мл полученной суспензии и центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 50 мМ фосфатного буфера.

9.2. Подготовка проб клинического, биологического материала.

Пробы крови

Кровь для исследования отбирают в объеме 1 мл и для предотвращения свертывания сразу добавляют 6 % раствор ЭДТА в соотношении 1:20. Аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом. Для обеззараживания к пробе добавляют раствор мертиолята натрия до конечной концентрации 0,1 мг/мл (1:1000) и инкубируют при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем отбирают в отдельную пробирку 200 мкл крови и добавляют 1 мл буфера, лизирующего эритроциты, следующего состава: 10 мМ Трис, pH 7,6, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ NaCl. Образцы перемешивают, инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин, затем центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 мин. Отбирают надосадочную жидкость, а к осадку клеток повторно добавляют 500 мкл буфера, лизирующего эритроциты. Повторяют этапы встряхивания, инкубирования и центрифугирования. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 50 мМ фосфатного буфера. Затем выполняют этапы лизиса и выделения ДНК.

Пробы мокроты

Мокроту забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл. Для разжижения мокроты применяют раствор «Муколизин» (Na_2HPO_4 0,0774 моль, NaH_2PO_4 0,0226 моль, бета-МЭ 0,094 моль, 5 % азид натрия в конечной концентрации 0,05 %, ФСР 2011/12082). Пробу смешивают с пятикратным объемом раствора «Муколизин»). Пробы перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 20-30 мин, периодически встряхивая. Затем отбирают 1 мл разжиженной мокроты и помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Пробу 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 (п.10.1).

Суспензии органов

Органы отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки печени, селезенки и легкого общей массой 1-2 г помещают в стерильную ступку, растирают и добавляют 0,9 % натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем добавляют раствор мертиолята натрия до конечной концентрации 0,1 мг/мл (1:1000) с последующим прогреванием их на водяной бане 40 мин при 56 ± 1 °C и инкубацией при комнатной температуре в течение 24 ч. Далее к исследуемым образцам для лизиса тканей органа добавляют раствор NaOH до конечной концентрации 50 мМ. Инкубируют в течение 10 мин при температуре (56 ± 1) °C и нейтрализуют равным объемом 1 М Трис, pH $8,0 \pm 0,1$. Центрифугируют в течение 5 мин при 6000 об/мин, надосадок удаляют, а осадок ресуспендируют в 100 мкл 50 мМ фосфатного буфера. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (п.10.1).

9.3. Подготовка проб из объектов окружающей среды

Вода открытых водоемов

Пробы берутся в затененном месте, на глубине 10-20 см от поверхности стоячей или слабопроточной воды в объеме 100-200 мл в стерильные емкости объемом 200-250 мл с завинчивающейся крышкой. Из одной точки берут 2 пробы. Для концентрирования

клеток гриба используют либо дробное центрифугирование, либо вакуумную фильтрацию.

Для дробного центрифугирования из пробы воды переносят по 35 мл в 3 (6) центрифужные пробирки с винтовой горловинной крышкой типа Falcon объемом 50 мл и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Осадок в пробирке ресуспендируют в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлористого. Из центрифужной пробирки переносят полученную суспензию в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин при 3000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК.

Для вакуумной фильтрации используют стерильные фильтры с размером пор 0,45 мкм. В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный пластиковый пакет объемом 100 мл, содержащий 10 мл 0,9 % раствора натрия хлористого. Фильтр внутри пакета растирают вручную в течение 1 мин. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1,0 мл в микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12000 в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (п.10.1).

Пробы почвы, погадок летучих мышей и птиц

Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы, погадки летучих мышей и птиц 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 3000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала и выделения ДНК (п.10.1).

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 стенки 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 (п.10.1).

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-анализ состоит из следующих этапов: обеззараживание материала, выделение ДНК; амплификация, анализ и учет результатов.

10.1. Обеззараживание материала

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с 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 подготовленным как описано выше (п.9.) образцам мокроты, воды открытых водоемов, проб почвы, погадок летучих мышей и птиц, смывов с поверхности и ОКВ добавляют раствор мертиолат-натрия до конечной концентрации 0,1 мг/мл (1:1000) с последующим прогреванием их на водяной бане 40 мин при 56 ± 1 °C и инкубацией при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем пробы центрифугируют в течение 10 мин на микроцентрифуге при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 50 мМ фосфатного буфера, pH $6,16 \pm 0,01$.

Далее во все подготовленные образцы добавляют 2 мкл раствора хитиназы с концентрацией 10 мг/мл на 100 мкл пробы, ресуспендированной в 50 мМ фосфатном буфере, pH $6,16 \pm 0,01$, и инкубируют при 37 °C в течение 1 ч. После чего добавляют 600 мкл лизирующего раствора (300 мкл лизирующего раствора, содержащего 6 М гуанидинтиоцианата натрия, и 300 мкл фенола, забуференного Трис-HCl, pH 8,0). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и прогревают при температуре (95 ± 1) °C в течение 30 мин. Затем пробирки центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 с для осаждения капель с крышки пробирки. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

10.2 Выделение ДНК

10.2.1 Выделение ДНК из суспензий культур микромицетов, проб воды, мокроты и смывов с поверхности осуществляют методом гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом

После этапа обеззараживания и лизиса в пробирку добавляют 60 мкл 3 Моль раствора натрий 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 изопропилового спирта для переосаждения ДНК, перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе и инкубируют при температуре минус (20 ± 1) °C в течение 1 ч. Затем центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин, осторожно удаляют супернатант. Добавляют 500 мкл 70° 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 ± 1) °C в течение 5 мин, затем растворяют в 100 мкл ТЕ-буфера.

10.2.2 Выделение ДНК из проб биологического материала, почвы, погадок летучих мышей и птиц осуществляют методом гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с нуклеосорбцией на силикагеле

После этапа обеззараживания и лизиса в пробирку добавляют 60 мкл 3 Моль раствора натрий 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 и проводят выделение ДНК методом нуклеосорбции на силикагеле с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб В» (при выделении ДНК из проб почвы, погадок летучих мышей и птиц, воды, смывов с поверхностей) или «Рибо-сорб» (при выделении ДНК из проб биологического материала) или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкциями к указанным наборам.

10.3 Проведение ПЦР – амплификация ДНК

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника и размораживают при комнатной температуре. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с аэрозольным барьером с помощью дозаторов переменного объема.

10.3.1 Подготовка пробирок для проведения ПЦР

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

1. Отобрать необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мкл для постановки реакции равное количеству исследуемых проб + 2 контрольных.
2. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке из расчета на N реакций:
 - ПЦР-смесь-1 *H.capsulatum* - 6 x (N+1) мкл,
 - ПЦР-буфер-2 - 5 x (N+1) мкл,
 - р-р $MgCl_2$ - 2,5 x (N+1) мкл,
 - *Taq-F*-ДНК-полимераза - 0,4 x (N+1) мкл,
 - ВКО (ДНК внутреннего контроля) - 1,5 x (N+1) мкл

Тщательно перемешать путем пипетирования или на вортексе.

3. Раскапать приготовленные смеси в пробирки по 15 мкл.
4. В готовые пробирки внести по 10 мкл исследуемых ДНК-проб.
5. Поставить контроли амплификации:
 - а) отрицательный контроль (К-) – вместо ДНК-пробы внести 10 мкл ТЕ- буфера.
 - б) положительный контроль (К+) – вместо ДНК-пробы внести 10 мкл образца положительного контроля (ПКО ДНК *H.capsulatum*).
6. Установить пробирки в реакционный модуль прибора.

10.3.2. Проведение реакции амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (табл. 3).

Программирование прибора «Rotor-Gene 6000» и создание шаблона теста. Для работы с прибором «Rotor-Gene 6000» следует использовать программу Rotor-Gene 6000 версии 1,7 (build 67) или выше. Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

1. Для программирования и создания шаблона следует выбрать в окне *New Run/Новый тест* режим программирования *Advanced /Детальный мастер*. Выбрать любой шаблон (например, *Dual Labeled Prob/Флуоресцентные зонды*) для редактирования и нажать кнопку *New /Новый*. В следующем окне выбрать тип ротора *36-Well Rotor/36-луночный ротор*.
2. В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси *Reaction Volum (μL)/Объем реакции* равный **25**. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 необходимо также установить галочку в боксе в строке **15 μL oil layer volum/15 μL объем масла/воска**, чтобы активировать эту нужную опцию.
3. В окне *Edit Profile/Редактор профиля* следует задать программу амплификации (табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации ДНК *H.capsulatum*

Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	20 с	10
	60	40 с	
3	95	20 с	35
	60*	40 с детекция флуоресц. сигнала	

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

4. Задать автоматическую калибровку для выбора параметра «gain»/«усиление сигнала». Для этого в окне *Channel Setup/Установки каналов* выбрать кнопку *Gain Optimization/Опт. уровня сигн.* В открывшемся окне *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала* нажать кнопку *Optimise Acquiring/Опт. Детект-мых*, пометить галочкой бокс в строке *Perform Optimization before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции*. Для каналов ROX/Orange и Cy5/Red нужно указать 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-ая пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Закрыть окно *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала*.
5. Перейти в следующее окно. Сохранить запрограммированный шаблон выполнения теста. Для этого нажать кнопку *Save Template/Сохр. шаблон*. Задать имя для файла шаблона, соответствующее названию заданной в нем программы амплификации и детекции. Сохранить файл в предлагаемую папку: *Templates/Шаблоны* и в ней папку *Quick Start Templates* закрыть окно *New Run Wizard/Мастер Нового Теста*. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне *New Run /Новый тест*.

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. **Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.**

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

10.4 Анализ и учет результатов

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора «Rotor-Gene 6000» по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов). Накопление продукта амплификации участка ДНК *H.capsulatum* детектируется по каналу ROX/Orange. Накопление продукта амплификации ДНК ВКО детектируется по каналу Cy5/Red.

1. Выбрать в главном меню значок меню «*Analysis /Анализ*», в ниспадающем меню выбрать вкладку «*Quantitation/Количественный*». Выполнить операцию для данных канала ROX/Orange, выбрав в поле «*Cicling A ROX /«Cicling A Orange*», затем для данных канала Cy5/Red, выбрав в поле «*Cicling A Cy5/«Cicling A Red*».

2. **Анализ результатов амплификации ДНК *H.capsulatum*, детектируемого по каналу ROX/Orange.** Щелкнуть кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу ROX/Orange. В меню над графиком должны быть включены кнопки «*Dynamic Tube/Динамич. Фон*» (включена по умолчанию), «*SlopeCorrect/Коррекция уклона*». Задать уровень пороговой линии – в меню «*CT Calculation/Вычисление CT*» ввести в текстовом поле «*Threshold/Порог*» значение 0,03. Нажав кнопку «*Outlier Removal/Устранение выбросов*», ввести в текстовом поле значение 10 (10 %). Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла *Ct* по каналу ROX/Orange для каждого образца («*Quant. Resultes – Cycling A. ROX*»/«*Quant. Resultes – Cycling A. Orange*»/«Количественные результаты - *Cycling A. Orange*»).
3. **Анализ результатов амплификации ДНК ВКО, детектируемого по каналу Cy5/Red.** Щелкнуть кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу Cy5/Red, включить в меню над графиком кнопки «*Dynamic Tube/Динамич. Фон*» (включена по умолчанию), «*SlopeCorrect/Коррекция уклона*», затем кнопку «*Outlier Removal/Устранение выбросов*» и ввести в текстовом поле значение 10 (10 %). Задать уровень пороговой линии – в меню «*CT Calculation/Вычисление CT*» ввести в текстовом поле «*Threshold/Порог*» значение 0,03. Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла *Ct* по каналу Cy5/Red для каждого образца («*Quant. Resultes – Cycling A. Cy5*»/«*Quant. Resultes – Cycling A. Red*»/«Количественные результаты - *Cycling A. Red*»).
4. Результаты интерпретируются следующим образом (табл. 4):
 - а) образец считается положительным, если в таблице результатов (пороговых циклов) по каналу ROX/Orange для него определено значение порогового цикла $Ct < 33$;
 - б) образец считается отрицательным, если в таблице результатов (пороговых циклов) 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;
 - в) образцы, для которых отсутствует значение *Ct* как по каналу ROX/Orange, так и по каналу Cy5/Red, или по каналу Cy5/Red получено значение *Ct* более 33, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.

Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

Пробы	Значения порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу		Результат анализа
	ROX/Orange	Cy5/Red	
Исследуемые пробы	≤ 33	< 33	Положительный/ В пробе выявлена ДНК <i>H.capsulatum</i>
	Нет значений	< 33	Отрицательный/ В пробе ДНК <i>H.capsulatum</i> не обнаружена

5. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (табл. 5).

Таблица 5

Контр оль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Значение Ct по каналу		Результат
		ROX/Orange	Cy5/Red	
«ОК»	Выделение ДНК	Нет значений	< 33	отрицательный
«К-»	ПЦР	Нет значений	< 33	отрицательный
«К+»	ПЦР	< 33	< 33	положительный

11. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

11.1. Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять ДНК *H.capsulatum* в суспензии концентрацией не менее 1×10^4 кл/мл.

11.2. Аналитическая специфичность.

Набор не должен давать положительных результатов с ДНК микроорганизмов других родов суспензиях концентрацией 1×10^4 кл/мл

11.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 % при исследовании 208 положительных образцов, содержащих *H.capsulatum* в концентрации не менее 1×10^4 кл/мл.

11.4. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - не менее 97 % с доверительной вероятностью 90% при исследовании 208 положительных образцов, содержащих *H.capsulatum* и 90 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium citreoviridae*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum immitis*, *Penicillium citrinum*, *Candida kruissi*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

13. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

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

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

Зав. отделом биологического и
технологического контроля
ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ
Роспотребнадзора

Директор ФКУЗ РосНИПЧИ
«Микроб» Роспотребнадзора

 Прохвятилова Е.В.

 Кутырев В.В.

11 (всего) листов(а)

Зав. отд. делопроизводства

Чернова Е.А.

Подпись

Е.А. Чернова

М-П

