

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления

ДНК *Epidermophyton floccosum* и ДНК *Trichophyton spp* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Epidermophyton floccosum*/*Trichophyton spp*»

ВВЕДЕНИЕ

Кожные микозы или дерматомикозы поражают кожу и ее придатки (волосы и ногти) на различных участках тела. К ним относятся трихофития (возбудители - грибы рода *Trichophyton*), эпидермофития (возбудитель – *Epidermophyton floccosum*) и микроспория (возбудители – грибы рода *Microsporum*). Инфицирующие агенты (фрагменты гиф и конидии) передаются контактным путём (Weitzman I, R C Summerbell R.C. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev. 1995 Apr;8(2):240-59. doi: 10.1128/CMR.8.2.240). Наиболее часто инфицирование происходит в банях, бассейнах и душевых. Выделяют 3 группы возбудителей, вызывающих дерматомикозы: антропофильные дерматомицеты, зоофильные дерматомицеты и геофильные дерматомицеты.

Поверхностные микозы кожи и ее придатков являются самыми распространенными микозами в мире, ежегодно от поверхностных дерматофитий страдает порядка одного миллиарда человек.

Дерматомицеты *Trichophyton spp* вызывают кольцевой лишай волосистой части головы, бороды, других участков кожи и ногтей. Возбудителями трихофитий являются *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton megninii*. Грибы располагаются в виде цепочек спор внутри или на поверхности пораженных волос или в виде гифов и спор в кожных чешуйках. *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* и *Trichophyton violaceum* вызывают заболевания только у людей (антропонозная

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР-наборов Трухиной А.В.

трихофития), а *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton megninii* – у человека и животных (зооантропонозная трихофития). Чаще всего трихофития протекает в виде поверхностного микоза с поражением кожи, волос, ногтей (онихомикоз). При трихофитии отмечается воспаление и шелушение кожи. Мицелий и споры гриба располагаются внутри волоса и снаружи (в виде чехлика). Внешне волосы выглядят как «пыльные или опутанные паутиной» и обламываются у поверхности кожи (Weitzman I, Padhye AA. Dermatophytes: gross and microscopic. Dermatol Clin. 1996 Jan;14(1):9-22. doi: 10.1016/s0733-8635(05)70320-x).

Эпидермофития представляет собой инфекционное заболевание, вызванное *Epidermophyton floccosum*, отличающееся высокой степенью заразности. *E. floccosum* поражает поверхностные кожные покровы, особенно на участках естественных складок (в подмышечной, паховой зонах), в области ногтевых пластинок. В зависимости от места локализации поражения различают эпидермофитию паха, стоп и ногтей. Чаще всего грибы *E. floccosum* вызывают кольцевой лишай кожи тела, рук и ступней. При этом заболевании нити гриба располагаются в коже, волосы в патологический процесс не вовлекаются. Эпидермофития стоп - поражения области подошв, преимущественно кожи межпальцевых промежутков. Для этого заболевания характерны пузырьки небольших размеров, трещины, очаги шелушения и эрозии (Литусов Н.В. Медицинская микология. Екатеринбург 2022).

При установлении диагноза, прежде всего, необходимо исключить другие грибковые заболевания. Атипичные формы трихофитии иногда следует дифференцировать с гнойничковым поражением кожи, вызванным стафилококком, простым лишаем, дисгидротической экземой (особенно, если процесс локализован в области кистей), нуммулярной и себорейной экземой, псориазом, пиодермитами и другими заболеваниями. Верным критерием в диагностике микотических инфекций является только положительный результат лабораторного исследования. Молекулярно-генетическое тестирование методом ПЦР имеет ряд преимуществ в сравнении с микроскопией и посевом на культуральные среды: высокая чувствительность и специфичность даже при низких нагрузках, возможность получить результаты исследования в короткий срок. Своевременная постановка диагноза позволяет подобрать эффективную антимикотическую терапию.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Epidermophyton floccosum* и ДНК *Trichophyton spp* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Epidermophyton floccosum*/*Trichophyton spp*» предназначен для качественного выявления

ДНК *Epidermophyton floccosum* и ДНК *Trichophyton spp*, выделенной из клинического биоматериала человека - образцов кожи и ее придатков (ногтей и волос), культур возбудителей микозов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор может быть использован для диагностики дерматофитий и для контроля эффективности лечения.

Набор не имеет популяционных и демографических аспектов применения.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца, и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов, и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО), который входит в состав наборов для выделения НК.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание</i>	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	2 пробирки по 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	96 пробирок
Оптическая пленка	1,5 листа
Вкладыш со штрих-кодом	1 шт.

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению и паспорт (количество копий определяется в договоре на поставку продукции).

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте ([http://www/vector-best.ru](http://www.vector-best.ru)).

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов кожи и ее придатков (волос и ногтей), культур возбудителей микозов с использованием наборов для выделения «РеалБест ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2015/2300), «Лизирующий раствор» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2017/5872) и «РеалБест УниМаг» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2017/5985).

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- термоблок для пробирок объемом 0,2 мл;
- каналы детекции: «FAM», «HEX», «ROX»;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °C;
- средняя скорость нагрева не менее 2,0 °C/сек;
- средняя скорость охлаждения не менее 1,0 °C/сек;
- точность поддержания температуры не более $\pm 0,3$ °C;
- однородность температуры не более $\pm 0,6$ °C.

Набор валидирован с амплификаторами: «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229), «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН 2022/16415).

По вопросам применения амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

Запуск программы амплификации и анализ результатов может производиться с помощью программного обеспечения «GP.РеалБест Диагностика» (размещена на сайте <http://www.vector-best.ru>).

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

Показания к применению. Набор может быть использован для диагностики дерматофитий и для контроля эффективности лечения. Набор не имеет популяционных и демографических аспектов применения.

Противопоказания. Не применимо. Изделие предназначено для клинической лабораторной диагностики.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность.

За аналитическую чувствительность принята величина концентрации целевой ДНК, для которой при экспериментальной проверке на двух сериях набора на 54 повторях для каждой серии с использованием каждого из заявленных амплификаторов и наборов для выделения был получен положительный результат в 100% случаев.

Набор гарантированно выявляет ДНК *Epidermophyton floccosum* и ДНК *Trichophyton spp* в концентрации 5 копий в ПЦР-пробе (соответствует 6×10^2 копий/мл исходного образца при выделении ДНК с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор» и 2×10^2 копий/мл исходного образца при выделении ДНК с помощью набора «РеалБест УниМаг»). Контролируется при выпуске тестированием образцов, приготовленных из стандартного образца предприятия с соответствующим содержанием ДНК *Epidermophyton floccosum* и ДНК *Trichophyton spp* в ПЦР-пробе.

3.2. Аналитическая специфичность.

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей микроорганизмов, которые могут присутствовать в клинических образцах (*Aspergillus spp*, *Candida spp*, *Cryptococcus spp*, *Penicillium spp*, *Microsporum spp*, *Histoplasma spp*, *Malassezia spp*, *Phialophora spp*, *Blastomyces spp*, *Coccidioides spp*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Herpesviridae*). Возможность перекрестных реакций исключена.

Аналитическая специфичность выявления ДНК *Epidermophyton floccosum* и ДНК

Trichophyton spp была подтверждена отсутствием перекрестных ложноположительных сигналов при анализе образцов, содержащих ДНК микроорганизмов, которые могут встретиться в биоматериале (*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida maltosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Clavispora lusitanae*, *Cutaneotrichosporon cutaneum*, *Debaryomyces hansenii*, *Filobasidium magnum*, *Fusarium verticillioides*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum fragrans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Microsporum canis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Nakaseomyces glabratus*, *Nannizzia incurvata*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia norvegensis*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma album*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, Human alphaherpesvirus 1, Human alphaherpesvirus 2) в концентрациях 10^6 - 10^7 копий/мл. Перекрестно реагирующих ДНК по данным, полученным при исследованиях в рамках клинико-лабораторных испытаний, обнаружено не было.

3.3. Диагностическая чувствительность.

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Epidermophyton floccosum*: клинические испытания, проведенные на 77 положительных образцах, содержащих ДНК *Epidermophyton floccosum*, показали 100% (интервал 95,26 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Trichophyton spp*: клинические испытания, проведенные на 111 положительных образцах, содержащих ДНК *Trichophyton spp*, показали 100% (интервал 96,73 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.4. Диагностическая специфичность.

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Epidermophyton floccosum*: клинические испытания, проведенные на 205 отрицательных образцах, не содержащих ДНК *Epidermophyton floccosum*, показали 100 % чувствительность (интервал 98,22 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95%);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Trichophyton spp*: клинические испытания, проведенные на 171 отрицательных образцах, не содержащих ДНК *Trichophyton spp*, показали 100 % чувствительность (интервал 97,87% - 100%, с доверительной вероятностью 95 %);

3.5. Повторяемость и воспроизводимость результатов.

При тестировании на одной серии набора, на одном оборудовании, одним оператором, в одной лаборатории 2 образцов в 10 повторах каждый, повторяемость составила 100%, коэффициент вариации C_t не более 3%.

При тестировании тремя операторами на двух сериях набора 2 образцов в 10 повторах каждый - межпостановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %, коэффициент вариации C_t не более 4 %.

3.6. Потенциально-интерферирующие вещества.

Интерферирующие вещества исследовали на модельных образцах клинического материала путем внесения известных количеств интерферентов. Показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ на результаты анализа: в образцах кожи – кровь до 0,5%; в образцах культуры возбудителей микозов – среда Сабуро до 25%.

Биоматериал не может быть проанализирован:

- если на кожу нанесен косметический крем и/или декоративная косметика (их необходимо удалить);
- если использовались антимикотические препараты местного действия менее чем за 48 часов до взятия биоматериала.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению ДНК *Epidermophyton floccosum* и ДНК *Trichophyton spp.*, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики (например, врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), иной специалист).

4.3. ПКО содержит натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– регистрирующий амплификатор планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, соответствующий требованиям, описанным в п. 2.3. данной инструкции (например, «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229) или «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН

2022/16415));

- ПЦР-бокс (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-"Ламинар-С", ЗАО «Ламинарные системы», Россия, РУ № ФСР 2010/07111);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, Sartorius, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия, РУ № РЗН 2019/9356);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, Sartorius, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия, РУ № РЗН 2020/9707);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», Ansell HealthCare, Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, штативы ООО «НПФ Хеликон», Россия, РУ № РЗН 2022/16372);
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария МК-01», КМ-Проект, Россия, РУ № РЗН 2017/5395);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

При проведении работ с исследуемыми образцами в лаборатории, включая процесс выделения НК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинических образцов с помощью соответствующих наборов серии «РеалБест», согласно инструкциям по применению. Наборы, подходящие для каждого вида клинических образцов, указаны в таблице:

Тип образца	Набор для выделения НК	
	«РеалБест ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2015/2300)*, «Лизирующий раствор» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2017/5872)	«РеалБест УниМаг» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2017/5985)
Кожа и ее придатки (волосы и ногти)	✓	✓
Культуры возбудителей микозов	✓	✓

*в состав набора входит Транспортный раствор.

Образцы кожи и ее придатков (волос и ногтей):

С помощью одноразового скальпеля взять соскоб из очага инфекционного процесса на коже.

Одноразовым пинцетом взять чешуйки с кожи головы или волосы, если поражена волосистая часть головы.

Образцы ногтевых пластин можно собрать с помощью стерильных инструментов, сделать соскоб с поверхности с помощью одноразового скальпеля или спилить одноразовой пилкой для ногтей.

Если биоматериал мелкодисперсный и его перенос затруднен, можно добавить 300 мкл «Транспортного раствора» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2017/6004). Для экстракции НК использовать 100 мкл суспензии.

Крупные куски ногтевых пластин (объемом не более двух спичечных головок) одноразовым пинцетом перенести в пробирку для дальнейшей экстракции НК.

Для транспортировки и хранения биоматериала использовать пробирки типа «Эппендорф».

Наиболее информативно производить взятие биоматериала из очага инфекционного процесса. Если очагов несколько, необходимо собрать биоматериал со всех участков, где имеются признаки поражения (из каждого очага в индивидуальную пробирку). Согласно поставленной диагностической задаче, лечащий врач принимает решение о выборе места взятия материала для исследования.

Образцы культур возбудителей микозов (смешанные или чистые), полученные при посеве клинического материала с инфицированных участков на культуральные среды, поместить в «Транспортный раствор» производства АО «Вектор-Бест», тщательно перемешать. 100 мкл полученной суспензии использовать для выделения ДНК.

Транспортировать и хранить образцы:

- кожи и ее придатков:

- при температуре (18–26) °C не более 72 часов;
- при температуре (2–8) °C не более 1 месяца;
- при температуре минус (18–40) °C не более 6 месяцев;
- при температуре ниже минус 40°C – длительно.

- культур возбудителей микозов:

- при температуре (18–26) °C не более 6 часов;
- при температуре (2–8) °C не более 3 суток;
- при температуре минус (18–40) °C не более 2 недель;

при температуре ниже минус 40°C – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °C не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °C не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество пробирок с ГРС по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы (1 ОКО и 1 ПКО). Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

***Внимание!** Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.*

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °C не более 3 месяцев.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °C не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС по числу подготовленных образцов, включая контрольные образцы, пронумеровать (если необходимо) и расположить в штативе.

***Внимание!** Надписи следует располагать на боковой части пробирок.*

7.2. Аккуратно удалить пленку, закрывающую пробирки.

***Внимание!** При удалении пленки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.*

В каждую пробирку с ГРС дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

7.3. Заклеить пробирки оптической пленкой.

***Внимание!** Нельзя наносить на оптическую пленку какие-либо надписи. Оптическая пленка должна оставаться чистой!*

Для повышения эффективности и скорости смешивания компонентов рекомендуется

перемешать содержимое пробирок в мини-шейкере с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

При использовании программного обеспечения прибора:

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК *Epidermophyton floccosum*, ДНК *Trichophyton spp* и детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

Протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд)*.

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК.

«FAM» – для регистрации сигнала амплификации ДНК ВКО;

«HEX» – для регистрации сигнала амплификации ДНК *Epidermophyton floccosum*;

«ROX» – для регистрации сигнала амплификации ДНК *Trichophyton spp*.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить амплификатор для выполнения заданного протокола.

При использовании программы «GP.РеалБест Диагностика»:

- запустить программное обеспечение «GP.РеалБест Диагностика»;

- ввести данные штрих-кода набора из вкладыша со штрих-кодом;

- запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами;

- запустить программу амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учета результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Epidermophyton floccosum* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Trichophyton spp* (канал «ROX») и

определять значение порогового цикла C_t ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX» и «ROX» с C_t , меньшим или равным 40.

Если для ОКО значение C_t по каналам «HEX» и/или «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

8.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1 Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ДНК *Epidermophyton floccosum*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» больше 40 или не определяется.

Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ДНК *Trichophyton spp*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Epidermophyton floccosum*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Trichophyton spp*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

При использовании программного обеспечения «GP.RealBest Диагностика» все описанные выше операции по анализу и учёту результатов выполняются программой.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. После первого вскрытия компоненты набора (ГРС, ПКО) хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

9.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

9.6. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте <http://www.vector-best.ru>.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК *Epidermophyton floccosum/Trichophyton spp*», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

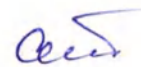
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Температурный диапазон
	Код партии		Дата изготовления
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Использовать до....	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор



В.К. Ткачев

Т.И. Поспелова



Пронумеровано, пронумеровано и
скреплено печатью 15 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

“12” 10 20 2011 Захарова Л.Н.

