

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления
ДНК *Microsporum canis complex* и ДНК *Nannizzia gypsea*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест ДНК *Microsporum canis complex*/*Nannizzia gypsea*»

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).

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

Микроспория – высококонтагиозная дерматофития, вызываемая грибами рода *Microsporum*, заболеванию подвержены как люди, так и животные. Попадая на кожу, грибок внедряется благодаря кератинолитическим ферментам, что способствует разрыхлению рогового слоя кожи и в последствии приводит к локальному поверхностному воспалению. Грибы рода *Microsporum* поражают только растущие волосы в фазе анагена. Грибок разрушает кутикулу, между чешуйками которой скапливаются споры. Таким образом, грибок окружает волос, формируя чехол, и плотно заполняет луковицу. Визуально можно обнаружить на коже небольшие очаги с обломанными волосами и мелкими чешуйками. Болеют преимущественно дети и молодые женщины, взрослые болеют реже. Это связано с тем, что с возрастом в коже и ее придатках повышается содержание органических кислот,

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

обладающих фунгистатическими свойствами. Кроме того, у детей имеется недостаточная плотность и компактность кератина клеток эпидермиса и волос, что также способствует внедрению и развитию грибов рода *Microsporum*.

Для микроспории характерна сезонность с пиками весной и осенью, возникновению заболевания могут способствовать эндогенные факторы: химический состав пота, состояние эндокринной и иммунной систем.

Наибольшее значение для человека из описанных видов, вызывающих микроспорию, имеют: *M. canis*, *M. ferrugineum*, *M. audouinii* и *Nannizzia gypsea* (этот вид ранее тоже относили к микроспорам, старое название *Microsporum gypseum*). Клинические проявления этих инфекций схожие.

Виды *M. canis*, *M. ferrugineum*, *M. audouinii* являются близкородственными и вместе образуют группу *Microsporum canis complex* (A Kaszubiak I, S Klein, G S de Hoog, Y Gräser. Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):179-86. doi: 10.1016/j.meegid.2003.12.004.). *M. canis* – наиболее часто регистрируемый в России возбудитель микроспории, относится к повсеместно распространенным в мире зоофильным грибам, вызывая заболевания у кошек (особенно часто - котят), собак, обезьян, реже – других животных. От животных *M. canis* передается человеку. *M. audouinii* – повсеместно встречающийся антропофильный возбудитель, чаще характеризуется меньшей выраженностью воспалительных явлений, протекающих в виде хронической инфекции. *M. ferrugineum* – антропофильный возбудитель, распространенный преимущественно в Азии (Китай, Япония), Восточной Европе, Центральной и Восточной Африке.

Nannizzia gypsea (*M. gypseum*) – геофильный, широко распространенный возбудитель, относится к числу почвенных сапрофитов. В большинстве случаев заболевание у человека возникает после контакта с почвой, реже – с инфицированными животными. Описаны случаи передачи инфекции в группах детей при контакте с песком (Souza BD, Sartori DS, Andrade C, Weisheimer E, Kiszewski AE. Dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in infants: report of four cases and review of the literature. An Bras Dermatol. 2016 Nov-Dec;91(6):823-825. doi: 10.1590/abd1806-4841.20165044.). При осмотре очага заражения *N. gypsea* с применением лампы Вуда свечение может отсутствовать или проявляться незначительно, поэтому необходимо использовать другие подходы для диагностики заболевания. 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 *Microsporium canis complex* и ДНК *Nannizzia gypsea* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Microsporium canis complex*/*Nannizzia gypsea*» предназначен для качественного выявления ДНК *Microsporium canis complex* и ДНК *Nannizzia gypsea*, 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 °С;
- средняя скорость нагрева не менее 2,0 °С/сек;
- средняя скорость охлаждения не менее 1,0 °С/сек;
- точность поддержания температуры не более $\pm 0,3$ °С;
- однородность температуры не более $\pm 0,6$ °С.

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 *Microsporum canis complex* и ДНК *Nannizzia gypsea* 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 *Microsporum canis complex* и ДНК *Nannizzia gypsea* 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*, *Trichophyton spp*, *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus spp*, *Penicillium spp*, *Histoplasma spp*, *Malassezia spp*, *Phialophora spp*, *Blastomyces spp*, *Coccidioides spp*, другие виды *Microsporum spp*, *Enterococcus spp*,

Staphylococcus spp., *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Herpesviridae*). Возможность перекрестных реакций исключена.

Аналитическая специфичность выявления ДНК *Microsporium canis complex* и ДНК *Nannizzia gypsea* 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 lusitaniae*, *Cutaneotrichosporon cutaneum*, *Debaryomyces hansenii*, *Epidermophyton floccosum*, *Filobasidium magnum*, *Fusarium verticillioides*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum fragrans*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Naganichia albida*, *Nakaseomyces glabratus*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia norvegensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma album*, *Nannizzia incurvata*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *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 *Microsporium canis complex*: клинические испытания, проведенные на 77 положительных образцах, содержащих ДНК *Microsporium canis complex*, показали 100 % чувствительность (интервал 95,32 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Nannizzia gypsea*: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах, содержащих ДНК *Nannizzia gypsea*, показали 100 % чувствительность (интервал 95,20 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.4. Диагностическая специфичность.

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Microsporium canis complex*: клинические испытания, проведенные на 181 отрицательных образцах, не содержащих ДНК *Microsporium canis complex*, показали 100 % чувствительность (интервал 97,98 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Nannizzia gypsea*: клинические испытания, проведенные на 183 отрицательных образцах, не содержащих ДНК *Nannizzia gypsea*, показали 100 % чувствительность (интервал 98,00 % - 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 повторях каждый, повторяемость составила 100%, коэффициент вариации C_t не более 3%.

При тестировании тремя операторами на двух сериях набора 2 образцов в 10 повторях 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 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению ДНК *Microsporium canis complex* и ДНК *Nannizzia gypsea*, 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 *Microsporium canis complex*, ДНК *Nannizzia gypsea* 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 *Nannizzia gypsea*;

«ROX» – для регистрации сигнала амплификации ДНК *Microsporium canis complex*.

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 с информацией;
- 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 учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Nannizzia gypsea* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Microsporium canis complex* (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 Ct, меньшим или равным 40.

Если для ОКО значение Ct 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 Ct ВКО.

8.2. Учёт результатов.

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

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

Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ДНК *Microsporium canis complex*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ 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 *Nannizzia gypsea*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Microsporium canis complex*, если для этого образца значение Ct 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.РеалБест 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 *Microsporium canis complex/Nannizzia gypsea*», 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;

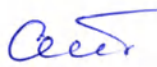
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

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

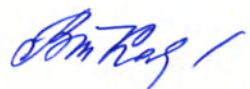
ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

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»

 В.К. Ткачев

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

 Т.И. Поспелова



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 15 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Д.Н.
" 02 " 10 20 24

