

Набор реагентов для выявления и количественного определения
ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*,
Trichophyton tonsurans методом полимеразной цепной реакции
с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* /
Trichophyton tonsurans» по ТУ 21.20.23-215-09286667-2023

АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 Trich, K2 Trich	6
2.4. Техническое обслуживание и ремонт	6
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	7
3.1. Внутренний контроль качества	7
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	8
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	9
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	10
6.1. Взятие исследуемого материала	10
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала	10
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	11
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	11
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	12
7.1. Образцы кожи	13
7.2. Образцы волос	13
7.3. Образцы ногтей	13
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	14
8.1. Предварительная подготовка исследуемого материала	14
8.2. Экстракция ДНК из исследуемого материала	14
8.3. Подготовка реагентов для амплификации	15
8.3.1. При использовании формы выпуска 1	15
8.3.2. При использовании формы выпуска 2	15
8.4. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	15
8.5. Анализ и вычисление результатов	17
8.6. Интерпретация результатов	17
8.7. Возможные ошибки и рекомендации по их решению	19
8.8. Диагностическое значение полученного результата	19
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	20
9.1. Предел обнаружения	20
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения	21
9.3. Аналитическая специфичность	21
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения	21
9.5. Правильность измерения	22
9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	22
9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ	23
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	25
10.1. Срок годности	25
10.2. Транспортирование	25
10.3. Хранение	25
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	25
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Сt	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
НК	– нуклеиновая кислота
К1	– калибровочный образец 1
К2	– калибровочный образец 2
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» по ТУ 21.20.23-215-09286667-2023.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» предназначен для выявления и количественного определения ДНК грибов, вызывающих микозы (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*), в биологическом материале (кожа и её придатки (волосы и ногти)) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans* методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на микозы, вызываемые дерматофитами (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*), и для мониторинга терапии. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор реагентов выпускается в двух формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все формы выпуска предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь <i>Trichophyton</i>	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
K1 Trich	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 Trich	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь <i>Trichophyton</i>	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) ¹	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
K1 Trich	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 Trich	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1 или 2)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде ² на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL³) и одновременной амплификации участков ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans* и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

¹ Пробирки с голубым парафином не используются.

² Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

³ ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин способствует восприимчивости контаминирующих ампликонов к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК выявляемых грибов и последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁴	ROX
ДНК-мишень	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i>	ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i>	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)
Область амплификации	ITS-2	ITS-2	искусственно синтезированная последовательность

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 Trich, K2 Trich

Измерение значений концентрации калибраторов K1 Trich и K2 Trich производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов K1 Trich и K2 Trich составляет не более 5 % (с уровнем доверительной вероятности 95 %).

2.4. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

⁴ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контроль экстракции (ОКО)⁵. Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать: отрицательный контроль ПЦР (К-) и положительные контроли (K1 Trich и K2 Trich). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans* и ВКО-FL. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительных контролей этапа ПЦР используются реагенты K1 Trich и K2 Trich, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans* в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов K1 Trich и K2 Trich. Исследование калибровочных образцов K1 Trich и K2 Trich проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов K1 Trich и K2 Trich и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если эффективность калибровки выходит за пределы граничных значений, необходимо повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

⁵ ОКО входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

3.1.3. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО, который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах, отрицательных на наличие ДНК выявляемых микроорганизмов, не обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL. Без использования ВКО-FL невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

4.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

4.8. Не применять набор при нарушении целостности упаковки и с истекшим сроком годности.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 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» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁶, биологический материал⁷, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁷ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в этом разделе.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Стерильный одноразовый скальпель или лезвие для образцов кожи и ее придатков (волос и ногтей). При поражении кожи делают соскоб с границы очага.

6.1.2. Одноразовые или стерильные многоразовые пинцеты и ножницы для взятия биологического материала (образцы кожи и ее придатков (волос и ногтей)). Пинцетом изымают на исследование волосы, помимо чешуек кожи головы, если поражена волосистая часть головы.

6.1.3. Завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки типа «Эппендорф» для хранения и транспортировки биологических образцов, стерильные.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.

6.2.2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью нагрева не менее чем до 95 °С.

6.2.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл.

6.2.4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 2 мл.

6.2.5. Вортекс.

6.2.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.7. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 до 8 °С.

6.2.8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.2.9. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (кожа и ее придатки (волосы и ногти)) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- состав набора включает внутренний контрольный образец;
- состав набора включает отрицательный контрольный образец экстракции;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 150 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошел набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм® ФАСТ-М».

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 1):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного либо планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX со следующими характеристиками:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4$ °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), Applied Biosystems QuantStudio 5 (РУ № РЗН 2019/8446), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

6.4.9. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат образцы кожи и ее придатков (волос и ногтей).

Наиболее информативными являются исследования материала, полученного непосредственно из потенциального очага инфекционного процесса. Поскольку инфекционный процесс может захватывать несколько очагов, для получения наиболее исчерпывающей информации пробы материала по возможности рекомендуется брать из всех очагов, где имеются признаки воспаления или находятся клетки-мишени для инфекционных агентов. Решение о выборе места взятия исследуемого материала принимает лечащий врач в зависимости от диагностической задачи.

ВНИМАНИЕ! Забор биоматериала не может быть осуществлен в условиях, указанных ниже:

- использовались антимикотические препараты топического применения в течение 48 часов;
- кожа была обработана кремом в течение 24 часов;
- использовалась декоративная косметика в течение 24 часов;
- использовались моющие средства с высоким содержанием щёлочи в течение 24 часов.

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Образцы кожи

С соблюдением правил асептики материал (мелкие кожные чешуйки и покрышки везикул) собирают стерильным пинцетом или соскабливают скальпелем на границе здоровой и пораженной кожи, так как микроорганизмы выявляются главным образом в периферической части очагов поражения, реже в центре. Образцы кожи помещают в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

Биологический материал, помещенный в стерильные пробирки, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) до месяца;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С для длительного хранения.

7.2. Образцы волос

При поражении волосистой части головы, с помощью стерильного пинцета, фрагменты волос и волосных фолликулов берут из середины очага поражения, выбирая наиболее поврежденные или обесцвеченные. Если дополнительно обнаруживаются участки поражения на голове, то материал собирают с помощью стерильного скальпеля по правилам сбора образцов с гладкой кожи. Образцы волос помещают в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

Биологический материал, помещенный в стерильные пробирки, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) до месяца;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С для длительного хранения.

7.3. Образцы ногтей

При дистальном поражении ногтевой пластины материал (подногтевой дебрис) получают выскабливанием одноразовым лезвием или скальпелем из-под ногтевого ложа. Дополнительно к подногтевому дебрису в ту же пробирку забирают срез ногтя. При проксимальном поражении ногтя материал получают соскабливающими движениями с поверхности пораженной части ногтевой пластины. Образцы ногтей помещают в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

Биологический материал, помещенный в стерильные пробирки, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) до месяца;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С для длительного хранения.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинично-диагностической лаборатории⁸:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1. Предварительная подготовка исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Перед экстракцией необходимо провести предобработку биоматериала.

8.1.1. В каждую пробирку с исследуемыми образцами добавить по **250 мкл Буфера М⁹**. Перемешать и осадить капли на вортексе.

8.1.2. Инкубировать пробирки в течение 10 минут при температуре **95 °С**.

8.1.3. После инкубации тщательно перемешать пробирки и осадить капли на вортексе.

8.1.4. Далее провести экстракцию в соответствии с инструкцией по применению набора, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала и удовлетворяющим требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Примечание: для последующего использования остатки образцов, предобработанных Буфером М, допустимо хранить при следующих условиях:

- при температуре от 2 до 8 °С до месяца;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С до года.

8.2. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем реагента ВКО-FL – **10 мкл** в пробирку для ОКО, а также в каждую пробирку с исследуемыми образцами;
- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **150 мкл** (согласно инструкции по применению к используемому набору для экстракции НК).

⁸ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁹ Буфер М входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

8.3. Подготовка реагентов для амплификации

8.3.1. При использовании формы выпуска 1

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.3.1.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси *Trichophyton*** и **ПЦР-буфера-Н**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь <i>Trichophyton</i>	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	$5,0 \cdot (N+1)$	

8.3.1.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью *Trichophyton*** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

8.3.1.3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.3.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.3.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.3.1.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

8.3.2. При использовании формы выпуска 2

8.3.2.1. Отобрать необходимое количество стрипов с **ПЦР-смесью *Trichophyton*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.3.2.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.3.2.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

8.4. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8.4.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

8.4.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционными смесями контрольные образцы:

При проведении качественного анализа:

а) положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К2** внести **10 мкл** реагента **К2 Trich**;

б) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**;

в) отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

При проведении количественного анализа:

а) образец **К1** – в одну пробирку для образца **К1** внести **10 мкл** реагента **К1 Trich**;

б) образец **К2** – в одну пробирку для образца **К2** внести **10 мкл** реагента **К2 Trich**;

в) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**;

г) отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

8.4.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G, ROX	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.4.4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.4.5. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

8.4.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.4.7. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.5. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по трем каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX
Продукт амплификации	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i>	ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i>	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)

8.6. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- в качественном формате вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 10;

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 9 и 10 соответственно.

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении качественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G и ROX не определено или определено выше граничного¹⁰.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G определено не выше граничного. При этом кривые флуоресценции данной пробы по данным каналам пересекают пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора ROX не учитывается.	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i> и/или ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i> обнаружена соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G не определено или определено выше граничного , а по каналу для флуорофора ROX значение Ct определено не выше граничного.	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i> и/или ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i> не обнаружена соответственно

Таблица 9

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G и ROX не определено или определено выше граничного¹⁰.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G не определено или определено выше граничного , а значение Ct по каналу для флуорофора ROX определено не выше граничного.	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i> и/или ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i> не обнаружена соответственно
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора. Значение Ct по каналу для флуорофора ROX не учитывается.	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i> и/или ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i> обнаружена в концентрации менее $1,0 \times 10^3$ копий/мл
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G находится в пределах линейного диапазона измерения набора. Значение Ct по каналу для флуорофора ROX не учитывается.	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i> и/или ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i> обнаружена в концентрации $X \times 10^Y$ копий/мл
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора. Значение Ct по каналу для флуорофора ROX не учитывается.	ДНК <i>Trichophyton rubrum</i> и/или ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i> обнаружена в концентрации более $1,0 \times 10^8$ копий/мл

Таблица 10

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
	FAM	R6G	ROX
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует		Значение Ct определено не выше граничного ¹⁰
K- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует		
K2 Trich (K2)	Значение Ct определено не выше граничного		Значение Ct отсутствует
K1 Trich (K1) K2 Trich (K2)	Показатель эффективности (E) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2		Значение Ct отсутствует

¹⁰ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

8.7. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.7.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации, или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.7.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G, и/или ROX определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации, или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.7.3. Для положительного контроля (K2 Trich) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено выше граничного. Необходимо повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.7.4. Если показатель эффективности E для калибраторов K1 Trich и K2 Trich по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.7.5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.7.6. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие, предварительную подготовку и исследование биологического материала.

8.8. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения¹¹

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составил $5,0 \times 10^2$ копий/мл (см. таблицу 11).

Значения предела обнаружения, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 11

Предел обнаружения набора

Микроорганизмы	Методика экстракции	Биоматериал	Предел обнаружения по Probit 95 %, копий/мл	95 %-ый доверительный интервал, копий/мл	
<i>Trichophyton rubrum</i>	Автоматическая методика экстракции (Microlab STARlet)	Кожа	$5,0 \times 10^2$	$4,31 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2$	
		Волосы	$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$	
		Ногти	$5,0 \times 10^2$	$4,01 \times 10^2 - 6,10 \times 10^2$	
<i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i>		Кожа	$5,0 \times 10^2$	$3,86 \times 10^2 - 5,71 \times 10^2$	
		Волосы	$5,0 \times 10^2$	$4,32 \times 10^2 - 6,93 \times 10^2$	
		Ногти	$5,0 \times 10^2$	$3,86 \times 10^2 - 5,71 \times 10^2$	
<i>Trichophyton rubrum</i>		Автоматическая методика экстракции (Auto-Pure 96)	Кожа	$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$
			Волосы	$5,0 \times 10^2$	$4,54 \times 10^2 - 7,07 \times 10^2$
			Ногти	$5,0 \times 10^2$	$4,32 \times 10^2 - 6,93 \times 10^2$
<i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i>	Кожа		$5,0 \times 10^2$	$4,01 \times 10^2 - 6,10 \times 10^2$	
	Волосы		$5,0 \times 10^2$	$4,31 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2$	
	Ногти		$5,0 \times 10^2$	$4,01 \times 10^2 - 6,10 \times 10^2$	
<i>Trichophyton rubrum</i>	Автоматическая методика экстракции (Nexog 96)		Кожа	$5,0 \times 10^2$	$4,32 \times 10^2 - 6,93 \times 10^2$
			Волосы	$5,0 \times 10^2$	$4,54 \times 10^2 - 7,07 \times 10^2$
			Ногти	$5,0 \times 10^2$	$4,31 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2$
<i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i>		Кожа	$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$	
		Волосы	$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$	
		Ногти	$5,0 \times 10^2$	$3,86 \times 10^2 - 5,71 \times 10^2$	
<i>Trichophyton rubrum</i>		Автоматическая методика экстракции (KingFisher Flex)	Кожа	$5,0 \times 10^2$	$4,32 \times 10^2 - 6,93 \times 10^2$
			Волосы	$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$
			Ногти	$5,0 \times 10^2$	$3,86 \times 10^2 - 5,71 \times 10^2$
<i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i>	Кожа		$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$	
	Волосы		$5,0 \times 10^2$	$4,31 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2$	
	Ногти		$5,0 \times 10^2$	$4,54 \times 10^2 - 7,07 \times 10^2$	
<i>Trichophyton rubrum</i>	Ручная методика с использованием центрифугирования		Кожа	$5,0 \times 10^2$	$4,01 \times 10^2 - 6,10 \times 10^2$
			Волосы	$5,0 \times 10^2$	$4,31 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2$
			Ногти	$5,0 \times 10^2$	$4,01 \times 10^2 - 6,10 \times 10^2$
<i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i>		Кожа	$5,0 \times 10^2$	$3,86 \times 10^2 - 5,71 \times 10^2$	
		Волосы	$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$	
		Ногти	$5,0 \times 10^2$	$4,54 \times 10^2 - 7,07 \times 10^2$	
<i>Trichophyton rubrum</i>		Ручная методика с использованием магнитного штатива	Кожа	$5,0 \times 10^2$	$4,32 \times 10^2 - 6,93 \times 10^2$
			Волосы	$5,0 \times 10^2$	$4,54 \times 10^2 - 7,07 \times 10^2$
			Ногти	$5,0 \times 10^2$	$4,31 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2$
<i>Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans</i>	Кожа		$5,0 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$	
	Волосы		$5,0 \times 10^2$	$3,86 \times 10^2 - 5,71 \times 10^2$	
	Ногти		$5,0 \times 10^2$	$4,01 \times 10^2 - 6,10 \times 10^2$	

¹¹ Предел обнаружения – 95 %-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемого возбудителя, при которой 95 % тестов дают положительный результат).

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» дает линейный ответ, приведен в таблице 12. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Линейный диапазон измерения набора

Биологический материал	Линейный диапазон измерения, копий/мл
Кожа	1,0×10 ³ – 1,0×10 ⁸
Волосы	
Ногти	

9.3. Аналитическая специфичность

Набор «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» обнаруживает только фрагменты ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов, вирусов (см. таблицу 13) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее 1×10⁶ копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК выявляемых микроорганизмов.

Таблица 13

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriae</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
HSV I	<i>Serratia marcescens</i>
HSV II	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Microsporum canis</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, вирусов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов биоматериала, предусмотренного назначением набора, стандартными образцами предприятия, содержащими ДНК выявляемых микроорганизмов. Были протестированы образцы в нескольких концентрациях ДНК выявляемых микроорганизмов:

- концентрация, соответствующая пределу обнаружения набора (5,0×10² копий/мл);
- концентрации, укладываемые в линейный диапазон (1,0×10³ копий/мл, 1,0×10⁶ копий/мл, 1,0×10⁸ копий/мл).

Каждый образец проходил все этапы исследования (предварительную подготовку исследуемого материала, экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

При оценке повторяемости и воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов для ДНК выявляемых микроорганизмов, не превышал 5 % и 10 % соответственно.

При оценке повторяемости и воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения концентрации для ДНК выявляемых микроорганизмов, не превышал 5 % и 10 % соответственно.

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 80 повторах для каждого вида биоматериала (см. таблицу 14).

Таблица 14

Правильность измерения

Мишень	Биоматериал	Среднее значение измерения, log ₁₀	Установленное значение концентрации, log ₁₀	Систематическая погрешность (В)	
				log ₁₀	%
<i>Trichophyton rubrum</i>	Ногти	5,68	5,70	0,02	0,38
<i>Trichophyton mentagrophytes complex</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i>		5,64		0,06	0,99
<i>Trichophyton rubrum</i>	Волосы	5,68	5,70	0,02	0,43
<i>Trichophyton mentagrophytes complex</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i>		5,69		0,01	0,23
<i>Trichophyton rubrum</i>	Кожа	5,66	5,70	0,04	0,76
<i>Trichophyton mentagrophytes complex</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i>		5,67		0,03	0,53

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 15.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие/отсутствие ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*, использовался набор реагентов «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» (РУ № РЗН 2023/19905).

**Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора
«АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* /
Trichophyton tonsurans»**

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	Количество	Образцы	Тестируемый набор «АмплиПрайм® <i>Trichophyton rubrum</i> / <i>Trichophyton mentagrophytes complex</i> / <i>Trichophyton tonsurans</i> »	Набор сравнения «АмплиПрайм® Дерматофиты (<i>Trichophyton</i> , <i>Epidermophyton</i> , <i>Microsporum</i>)»
Кожа	173	Положительных	50	50
		Отрицательных	123	123
Волосы	164	Положительных	50	50
		Отрицательных	114	114
Ногти	166	Положительных	50	50
		Отрицательных	116	116

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 16.

Таблица 16

**Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* /
Trichophyton mentagrophytes complex / *Trichophyton tonsurans*»**

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Кожа	100 % (97,05 % – 100 %)	100 % (92,89 % - 100 %)
Волосы	100 % (96,82 % – 100 %)	100 % (92,89 % - 100 %)
Ногти	100 % (96,87 % – 100 %)	100 % (92,89 % - 100 %)

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 17, в максимально возможной концентрации.

Отсутствие влияния интерферирующих веществ для образцов кожи, волос и ногтей (гемоглобин, кетоконазол, тербинафин, клотримазол, аморолфин, циклопирокс, нафтифин) было показано в испытаниях с использованием набора для экстракции «МагноПрайм® ФАСТ-М».

**Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм®
Trichophyton rubrum / Trichophyton mentagrophytes complex / Trichophyton tonsurans»**

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
образцы кожи	гемоглобин	200 мг/мл
	кетоназол	20 мкг/мл
	тербинафин	20 мкг/мл
	клотримазол	20 мкг/мл
образцы ногтей	аморолфин	20 мкг/мл
	циклопирокс	20 мкг/мл
	бифоназол	20 мкг/мл
образцы волос	кетоназол	20 мкг/мл

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации $1,0 \times 10^8$ копий/мл.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси *Trichophyton* и ПЦР-буфера-Н, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® *Trichophyton rubrum* / *Trichophyton mentagrophytes complex* / *Trichophyton tonsurans*» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Номер серии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		