АмплиПрайм

IVD

Набор реагентов для выявления ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» по ТУ 21.20.23-183-09286667-2022

АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 7
2.3. Техническое обслуживание и ремонт 8
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 8
3.1. Внутренний контроль качества 8
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ 10
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 13
6.1. Взятие исследуемого материала 13
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала 13
6.3. Автоматическая методика экстракции ДНК 13
6.4. Ручная методика экстракции ДНК 14
6.5. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 14
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 16
7.1. Образцы кожи 16
7.2. Образцы волос 16
7.3. Образцы ногтей 16
8. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 17
8.1. Предварительная подготовка исследуемого материала 17
8.2. Автоматическая методика экстракции 17
8.3. Ручная методика экстракции с использованием магнитного штатива 18
8.4. Ручная методика экстракции с использованием центрифугирования 19
8.5. Хранение очищенной ДНК 20
9. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 21
9.1. Подготовка реагентов для амплификации 21
9.2. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции 22
9.3. Анализ и вычисление результатов 23
9.4. Интерпретация результатов 23
9.5. Возможные ошибки и рекомендации по их решению 25
9.6. Диагностическое значение полученного результата 26
10. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 26
10.1. Предел обнаружения 26
10.2. Аналитическая специфичность 26
10.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения 26
10.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 27
10.5. Оценка влияния интерферирующих веществ 28
11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 29
11.1. Срок годности 29
11.2. Транспортирование 29
11.3. Хранение 29
12. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 29
13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 30

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
НК	– нуклеиновая кислота
ПК	– положительный контроль
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 ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» по ТУ 21.20.23-183-09286667-2022.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)», а также сокращение Набор реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» предназначен для выявления ДНК грибов, вызывающих микозы (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*) в биологическом материале (кожа и ее придатки (волосы и ногти)) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплекта для экстракции, входящего в состав набора.

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* 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*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*) и для мониторинга терапии. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

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

1.6. Потенциальные пользователи: Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

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

1.8. Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции и случаи, когда забор биоматериала был 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.

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 предназначены для проведения экстракции ДНК и последующей амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Форма выпуска 1 включает комплект для экстракции ДНК, рассчитанный на проведение экстракции ДНК из 96 образцов, и комплект для ПЦР, рассчитанный на проведение амплификации 100 образцов, включая контроли. Комплект для экстракции может быть использован как для ручной экстракции, так и совместно с автоматическими станциями для экстракции НК. Комплект для ПЦР включает две ПЦР-смеси в пробирках объемом 1,5 или 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Комплект для ПЦР предназначен для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и может быть использован как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 2 включает комплект для экстракции ДНК, рассчитанный на проведение экстракции ДНК из 96 образцов, и комплект для ПЦР, рассчитанный на проведение амплификации 100 образцов, включая контроли. Комплект для экстракции может быть использован как для ручной экстракции, так и совместно с автоматическими станциями для экстракции НК. Комплект для ПЦР включает две ПЦР-смеси, раскапанных под прослойку парафина по стрипованным пробиркам объемом 0,2 мл (12,5 стрипов по 8 пробирок). Комплект для ПЦР предназначен для применения совместно с амплификаторами планшетного типа.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
Комплект для экстракции			
Буфер L[1]  Опасно	24,0	1 флакон	Лизирующий раствор. Прозрачная жидкость[2].
Буфер М	27,0	1 флакон	Раствор для предобработки. Прозрачная жидкость.
Буфер Е	77,0	1 флакон	Раствор для отмывки и элюции. Прозрачная жидкость.
МГС	1,10	1 пробирка	Магнетизированная силика. Суспензия.
ВКО-FL	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Комплект для ПЦР			
ПЦР-смесь Дерматофиты	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-смесь *T. tonsurans*	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	2 пробирки	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Дерматофиты	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ПКО *T. tonsurans*	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

[1] Буфер L содержит опасные вещества. Информацию по опасным веществам и мерам предосторожности при работе с Буфером L см. в разделе инструкции «Меры предосторожности и предупреждения».
[2] При хранении Буфера L возможно образование осадка в виде кристаллов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 2			
Комплект для экстракции			
Буфер L[3]  Опасно	24,0	1 флакон	Лизирующий раствор. Прозрачная жидкость[4].
Буфер М	27,0	1 флакон	Раствор для предобработки. Прозрачная жидкость.
Буфер Е	77,0	1 флакон	Раствор для отмывки и элюции. Прозрачная жидкость.
МГС	1,10	1 пробирка	Магнетизированная силика. Суспензия.
ВКО-FL	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Комплект для ПЦР			
ПЦР-смесь Дерматофиты	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[5]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин синего цвета.
ПЦР-смесь *T. tonsurans*	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[5]	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	2 пробирки	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
ПКО Дерматофиты	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ПКО *T. tonsurans*	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	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[6] на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство. Методика экстракции ДНК	в бумажном виде	1
Краткое руководство. Методика амплификации	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

[3] Буфер L содержит опасные вещества. Информацию по опасным веществам и мерам предосторожности при работе с Буфером L см. в разделе инструкции «Меры предосторожности и предупреждения».
[4] При хранении Буфера L возможно образование осадка в виде кристаллов.
[5] Пустые пробирки не используются.
[6] Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*) 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.

Исследуемый образец предварительно обрабатывается раствором для разрушения клеточной стенки гриба, затем в объеме 100 мкл обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц магнетизированной силики – магнитного сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента на магнитном штативе/стержне или с использованием центрифуги и с последующей отмывкой сорбента. При добавлении буфера для элюции ДНК к магнитному сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который затем отделяется от частиц сорбента магнитной силой либо центрифугированием.

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.

Каждый исследуемый образец тестируется в 2-х пробирках, в которых в ходе амплификации одновременно амплифицируются участки ДНК выявляемых грибов и последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции для ПЦР-смеси Дерматофиты (см. таблицу 3) и по двум каналам для ПЦР-смеси *T. tonsurans* (см. таблицу 4).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции для ПЦР-смеси Дерматофиты

Канал для флуорофора	FAM	R6G[7]	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК *Trichophyton rubrum*	ДНК *Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans*	ДНК *Microsporum canis*	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)	ДНК *Epidermophyton floccosum*
Область амплификации	ITS-2	ITS-2	ITS-2	Искусственно синтезированная последовательность	ITS-2

Таблица 4

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции для ПЦР-смеси *T. tonsurans*

Канал для флуорофора	FAM	R6G
ДНК-мишень	ДНК *Trichophyton tonsurans*	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)
Область амплификации	ITS-1	Искусственно синтезированная последовательность

2.3. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

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). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательный контроль ПЦР (К-) и положительные контроли (ПКО Дерматофиты для ПЦР-смеси Дерматофиты и ПКО *T. tonsurans* для ПЦР-смеси *T. tonsurans*). 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*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*. 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.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* 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 ПЦР используются реагенты ПКО Дерматофиты и ПКО *T. tonsurans*, 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. 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.

3.1.3. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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».

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. Исследования по детекции нуклеиновых кислот должны проводиться в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

5.3. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 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, упаковку[8], биологический материал[9], 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 клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

- 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.

- Входящий в состав набора реагент Буфер L содержит опасные вещества, указанные в таблице 5. Заявления об опасности и меры предосторожности, требуемые при работе с данным реагентом, описаны в таблице 5. Расшифровка кодов для заявлений об опасности и мер предосторожности представлена в таблице 6.

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 5

Заявления об опасности и меры предосторожности при работе с Буфером L

Реагент	Опасные вещества	Заявления об опасности	Меры предосторожности
Буфер L	изопропанол, гуанидин гидрохлорид, гуанидин тиоцианат, тритон X-100, 1-тиоглицерол	H225, H302, H311, H312, H315, H319, H332, H336, H411, H412, EUH032	P210, P233, P241, P242, P261, P264, P270, P271, P273, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P312, P332+P313, P337+P313, P362+P364, P370+P378, P403+P235, P501

Таблица 6

Расшифровка кодов для заявлений об опасности и мер предосторожности

Заявления об опасности	
H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. H302: Вредно при проглатывании. H311: Токсично при контакте с кожей. H312: Вредно при контакте с кожей. H315: Вызывает раздражение кожи. H319: Вызывает серьезное раздражение глаз. H332: Вредно при вдыхании.	H336: Может вызвать вялость или сонливость. H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. EUH032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.
Меры предосторожности	
P210: Хранить вдали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить. P233: Хранить в плотно закрытой таре. P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование. P242: Используйте только неискрящие инструменты. P261: Избегать вдыхания паров. P264: Вымойте руки после работы тщательно. P270: Не есть, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз. P303+P361+P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой или принять душ. P312: Обратиться к врачу при плохом самочувствии.	P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз, снять их и продолжить промывание водой. P332+P313: При раздражении кожи: обратиться к врачу. P337+P313: Если раздражение глаз не проходит обратиться за медицинской консультацией. P362+P364: Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения. P403+P235: Хранить в прохладном, хорошо вентилируемом месте. P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами 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».

- Остальные реагенты, входящие в состав набора, содержат азид натрия в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

- Лист безопасности реагента Буфер L доступен по запросу.

- Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека. При аварийных ситуациях возможно причинение вреда при попадании на кожу и слизистую оболочку глаз, при вдыхании и при проглатывании.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

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

6.1.2. Одноразовые 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.

6.2.5. Вортекс.

6.2.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.7. Холодильник 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. Автоматическая методика экстракции ДНК

ВНИМАНИЕ! При работе с набором следует использовать только одноразовые полипропиленовые пробирки и наконечники, сертифицированные на отсутствие ДНКаз.

6.3.1. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.

6.3.2. Вортекс.

6.3.3. Автоматическая станция для экстракции НК, зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:

- возможность реализации последовательности этапов экстракции, описанной в разделе «Экстракция ДНК из исследуемого материала» (п. 8.2.2);
- наличие системы дозирования жидкостей;
- наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнетизированной силики;
- наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 60 °С;
- наличие системы перемешивания жидкостей шейкированием или пипетированием.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие автоматические станции для экстракции нуклеиновых кислот: Microlab STARlet (РУ № РЗН 2018/6981), KingFisher Flex (РУ № ФСЗ 2009/05562).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.3.4. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя.

6.3.5. Холодильник от 2 до 8 °С.

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

6.3.7. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

6.4. Ручная методика экстракции ДНК

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл, свободные от ДНКаз.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

6.4.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.4.4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

6.4.5. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл - при проведении экстракции с использованием магнитного штатива (см. раздел «Экстракция ДНК из исследуемого материала», п. 8.3).

6.4.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g - при проведении экстракции с использованием центрифугирования (см. раздел «Экстракция ДНК из исследуемого материала», п. 8.4).

6.4.7. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.

6.4.8. Вортекс.

6.4.9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью нагрева не менее чем до 60 °С.

6.4.10. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.4.11. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.12. Холодильник от 2 до 8 °С.

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

6.4.14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

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

6.5.1. 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 реакционных смесей.
- 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.

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

6.5.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

6.5.5. Центрифуга-вортекс.

6.5.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.5.7. 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 реакционных смесей с использованием автоматической станции.

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

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 со следующими характеристиками:

Таблица 7

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
Cy5	620	640	660	690
Cy5.5	660	690	705	750

- наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры ≤ ±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»: С1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

6.5.9. Холодильник от 2 до 8 °С.

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

6.5.11. Емкость для сброса наконечников.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- кожа и ее придатки (волосы и ногти).

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 необходимо 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.

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 одноразовым скальпелем берется материал в максимальном количестве с пораженных участков кожи. Образцы кожи 0,5 – 3 г поместить в стерильные пробирки 1,5 – 2,0 мл.

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

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 72 часов.

Замораживание материала не допускается.

7.2. Образцы волос

При поражении волосистой части головы с наиболее видоизмененных участков, с помощью пинцета, берут волосы. Образцы волос 0,5 – 3 г поместить в стерильные пробирки 1,5 – 2,0 мл.

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

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 72 часов.

Замораживание материала не допускается.

7.3. Образцы ногтей

При поражении ногтей соскобы с ногтевых пластин или их срезы берутся при помощи одноразового стерильного скальпеля или ножниц. Образцы ногтей 0,5 – 3 г поместить в стерильные пробирки 1,5 – 2,0 мл.

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

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 72 часов.

Замораживание материала не допускается.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Экстракция ДНК должна проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[10]:

- 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 М**. 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 п. 8.2, 8.3 или 8.4.

8.2. Автоматическая методика экстракции

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции НК необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации данной автоматической станции и запрограммировать последовательность действий, указанную в п. 8.2.2.

8.2.1. Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК

8.2.1.1. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования).

8.2.1.2. Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

8.2.2. Процедура экстракции ДНК

8.2.2.1. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл или ячейку картриджа (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов раздельно по **10 мкл ВКО-FL**, **10 мкл МГС** и **200 мкл Буфера L** или **по 220 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL**, **МГС** и **Буфера L.**

8.2.2.2. Внести в пробирки исследуемые и контрольные (ОКО) образцы в объеме **100 мкл**, используя для каждого образца отдельный наконечник. Перемешать содержимое пробирок.

8.2.2.3. Прогреть пробирки при температуре **60 °С** в течение **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок.

8.2.2.4. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин**.

[10] 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».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.2.2.5. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

8.2.2.6. Добавить в пробирки по **500 мкл Буфера E** и, не перемешивая, удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера E содержимое пробирок не перемешивать.

8.2.2.7. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера E**, перемешать.

8.2.2.8. Прогреть пробирки при температуре **60 °C** в течение **5 мин** с включенным перемешиванием.

8.2.2.9. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин**.

8.2.2.10. Вынуть магнитный стержень с силикой из пробирок или при использовании магнитного штатива перенести надосадочную жидкость в новую пробирку или плашку.

8.2.2.11. Элюат содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

8.3. Ручная методика экстракции с использованием магнитного штатива

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

8.3.1. Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК

8.3.1.1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный (ОКО) контроль). Промаркировать.

8.3.1.2. Перемешать взбалтыванием Буфер L и Буфер E.

8.3.1.3. Перемешать ВКО-FL и осадить капли на вортексе.

8.3.1.4. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

8.3.1.5. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь ВКО-FL и МГС, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL** и **10 мкл МГС**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °C.

8.3.2. Процедура экстракции ДНК

8.3.2.1. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл для исследуемых и контрольных образцов:

а) по **20 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL** и **МГС** и по **200 мкл Буфер L**

или

б) по **220 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL**, **МГС** и **Буфера L**.

8.3.2.2. Внести в пробирки исследуемые и контрольные (ОКО) образцы в объеме **100 мкл**, используя для каждого образца отдельный наконечник. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.3.2.3. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8.3.2.4. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.

8.3.2.5. Без снятия пробирок с магнитного штатива, по внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

8.3.2.6. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в них по **500 мкл Буфера Е**.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера Е содержимое пробирок не перемешивать.

8.3.2.7. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.3.2.5.

8.3.2.8. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера Е**, перемешать на вортексе.

8.3.2.9. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **5 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

8.3.2.10. Осадить капли на вортексе и поместить пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.

8.3.2.11. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК для проведения дальнейшего исследования осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

8.4. Ручная методика экстракции с использованием центрифугирования

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

8.4.1. Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК

8.4.1.1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный (ОКО) контроль). Промаркировать.

8.4.1.2. Перемешать взбалтыванием Буфер L и Буфер Е.

8.4.1.3. Перемешать ВКО-FL и осадить капли на вортексе.

8.4.1.4. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

8.4.1.5. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь **ВКО-FL** и **МГС**, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL** и **10 мкл МГС**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.4.2. Процедура экстракции ДНК

8.4.2.1. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл, подготовленную для исследуемых и контрольных образцов:

а) по **20 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL** и **МГС** и по **200 мкл Буфер L**;

или

б) по **220 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL**, **МГС** и **Буфера L**.

8.4.2.2. Внести в пробирки исследуемые и контрольные (ОКО) образцы в объеме **100 мкл**, используя для каждого образца отдельный наконечник. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

8.4.2.3. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.4.2.4. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

8.4.2.5. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

8.4.2.6. Добавить в пробирки по **500 мкл Буфера E**.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера Е содержимое пробирок не перемешивать.

8.4.2.7. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

8.4.2.8. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.4.2.5.

8.4.2.9. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера E**, перемешать на вортексе.

8.4.2.10. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

8.4.2.11. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

8.4.2.12. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

ВНИМАНИЕ! Внесение ДНК в реакцию необходимо провести незамедлительно после центрифугирования. Если в течение 3 мин после центрифугирования проба не внесена в реакцию, необходимо провести повторное центрифугирование.

8.5. Хранение очищенной ДНК

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

Для хранения ДНК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Амплификация должна проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[11]:

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

9.1. Подготовка реагентов для амплификации

9.1.1. При использовании формы выпуска 1

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

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

9.1.1.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Дерматофиты / ПЦР-смеси *T. tonsurans*** и **ПЦР-буфера-Н**, требующиеся для приготовления 2-х реакционных смесей (см. таблицу 8). Каждую смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 8

Расчет объемов компонентов реакционных смесей

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Дерматофиты / ПЦР-смесь *T. tonsurans*	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Тестирование можно проводить, как одновременно на двух смесях для всех образцов, так и по отдельности (тестирование на ПЦР-смеси *T. tonsurans* целесообразно только для образцов положительных по каналу R6G ПЦР-смеси Дерматофиты). Возможно тестирование в разных реакционных блоках.

9.1.1.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Дерматофиты / ПЦР-смесью *T. tonsurans*** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

9.1.1.3. Приготовить реакционные смеси в 2-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 9.1.1.1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

9.1.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

9.1.1.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленных **реакционных смесей**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

9.1.2. При использовании формы выпуска 2

9.1.2.1. Отобрать необходимое количество стрипов с **ПЦР-смесью Дерматофиты / ПЦР-смесью *T. tonsurans*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Тестирование можно проводить, как одновременно на двух смесях для всех образцов, так и по отдельности (тестирование на ПЦР-смеси *T. tonsurans* целесообразно только для образцов положительных по каналу R6G ПЦР-смеси Дерматофиты). Возможно тестирование в разных реакционных блоках.

[11] 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».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

9.2. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК 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.

9.2.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционными смесями по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции. Выделенная ДНК из образца от одного пациента вносится в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью.

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

а) положительные контроли ПЦР – в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью для образцов **ПК** внести **10 мкл** реагента **ПКО Дерматофиты** (в пробирку с ПЦР-смесью Дерматофиты) и **10 мкл** реагента **ПКО *T. tonsurans*** (в пробирку с ПЦР-смесью *T. tonsurans*).

б) отрицательный контроль ПЦР – в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью для образцов **К-** внести по **10 мкл реагента К-**.

в) отрицательный контроль экстракции – в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью для образцов **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

9.2.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 9).

Таблица 9

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, Cy5, Cy5.5	

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.

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

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

9.2.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3. Анализ и вычисление результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- 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/;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

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.

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 пяти каналам детекции для ПЦР-смеси Дерматофиты и по двум каналам детекции для ПЦР-смеси *T. tonsurans* (см. таблицу 10).

Таблица 10

Детекция флуоресцентного сигнала

ПЦР-смесь	**Канал для флуорофора**				
	FAM	**R6G**	**ROX**	**Cy5**	**Cy5.5**
	Продукт амплификации				
ПЦР-смесь Дерматофиты	ДНК *Trichophyton rubrum*	ДНК *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*	ДНК *Microsporum canis*	ДНК ВКО	ДНК *Epidermophyton floccosum*
ПЦР-смесь *T. tonsurans*	ДНК *Trichophyton tonsurans*	ДНК ВКО	–	–	–

9.4. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицами 11 и 13 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблицах 12 и 14;

- 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 11 и 13 и таблицах 12 и 14 соответственно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов на ПЦР-смеси Дерматофиты

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM**, **R6G**, **ROX**, **Cy5** и **Cy5.5 не определено или определено выше граничного**[12].	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и/или **R6G** и/или **ROX** и/или **Cy5.5 определено не выше граничного**. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5** не учитывается.	**ДНК *Trichophyton rubrum*** и/или **ДНК *Trichophyton mentagrophytes complex***, ***Trichophyton tonsurans*** и/или **ДНК *Microsporum canis*** и/или **ДНК *Epidermophyton floccosum* обнаружена** соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM**, **R6G**, **ROX** и **Cy5.5 не определено или определено выше граничного**, а по каналу для флуорофора **Cy5 определено не выше граничного.**	**ДНК соответствующих выявляемых микроорганизмов не обнаружена**

Таблица 12

Критерии валидности для контрольных образцов на ПЦР-смеси Дерматофиты

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует			Значение Ct определено не выше граничного[12]	Значение Ct отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует				
ПКО Дерматофиты	Значение Ct определено не выше граничного				

Таблица 13

Интерпретация результатов для исследуемых образцов на ПЦР-смеси *T. tonsurans*

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и **R6G не определено или определено выше граничного**[12].	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G** не учитывается.	**ДНК *Trichophyton tonsurans* обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM не определено или определено выше граничного**, а по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного.**	**ДНК *Trichophyton tonsurans* не обнаружена**

ВНИМАНИЕ! При обнаружении ДНК *Trichophyton tonsurans* на ПЦР-смеси *T. tonsurans*, на ПЦР-смеси Дерматофиты должен присутствовать положительный сигнал по каналу R6G.

[12] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 14

Критерии валидности для контрольных образцов на ПЦР-смеси *T. tonsurans*

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует	Значение Ct определено не выше граничного[13]
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует	
ПКО *T. tonsurans*	Значение Ct определено не выше граничного	

9.5. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

9.5.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) при тестировании на ПЦР-смеси Дерматофиты по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5.5 или при тестировании на ПЦР-смеси *T. tonsurans* по каналу для флуорофора FAM 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 выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

9.5.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, 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 выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа амплификации ДНК.

9.5.3. Для положительного контрольного образца (ПКО Дерматофиты) по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. Вероятна ошибка на этапе амплификации, необходимо провести повторно этап ПЦР для всех отрицательных образцов.

9.5.4. Для положительного контрольного образца (ПКО *T. tonsurans*) по каналам для флуорофоров FAM, R6G значение Ct отсутствует или определено больше граничного. Вероятна ошибка на этапе амплификации, необходимо провести повторно этап ПЦР для всех отрицательных образцов.

9.5.5. 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.

9.5.6. 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 образца.

[13] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.6. 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.

10. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1. Предел обнаружения[14]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составил 5×10^2 копий/мл.

Значение предела обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

10.2. Аналитическая специфичность

Набор «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» обнаруживает только фрагменты ДНК *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans, Microsporum canis, Epidermophyton floccosum*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов, вирусов (см. таблицу 15) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее $1x10^6$ копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК выявляемых микроорганизмов.

Таблица 15

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Staphylococcus aureus	*Candida albicans*
Staphylococcus epidermidis	*Corynebacterium pseudodiphtheriae*
Streptococcus agalactiae	*Enterobacter cloacae*
Streptococcus pyogenes	*Enterobacter aerogenes*
HSV I	*Serratia marcescens*
HSV II	*Neisseria gonorrhoeae*

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

10.3. 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 двух концентрациях ДНК выявляемых микроорганизмов, одна из которых соответствовала пределу обнаружения набора (5×10^2 копий/мл), а вторая двукратно превышала предел обнаружения (1×10^3 копий/мл). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

10.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 16.

В качестве методик сравнения, с помощью которых устанавливали наличие/отсутствие ДНК *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* в биоматериале, использовались метод микроскопии и метод культурального исследования с идентификацией полученной чистоты культуры на масс-спектрометре Vitek MS методом MALDI-TOF.

Таблица 16

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton, Epidermophyton, Microsporum*)»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования			
Тип	Количество	Образцы	Тестируемый набор	Методика сравнения	
			«АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)	Микроскопия	Культуральное исследование с идентификацией полученной чистой культуры на масс-спектрометре Vitek MS методом MALDI-TOF
Кожа	100	Положительных	50	50	50
		Отрицательных	50	50	50
Волосы	100	Положительных	50	50	50
		Отрицательных	50	50	50
Ногти	100	Положительных	50	50	50
		Отрицательных	50	50	50

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 17.

Таблица 17

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)»

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Кожа	100 % (92,89 % – 100 %)	100 % (92,89 % - 100 %)
Волосы	100 % (92,89 % – 100 %)	100 % (92,89 % - 100 %)
Ногти	100 % (92,89 % – 100 %)	100 % (92,89 % - 100 %)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 18, в максимально возможной концентрации.

Таблица 18

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton, Epidermophyton, Microsporum*)»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
образцы кожи	гемоглобин	200 мг/мл
	кетоконазол	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	кетоконазол	20 мкг/мл

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации $1{,}0\times10^8$ копий/мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1. 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.

11.2. 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.

11.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. При получении допускается разукомплектовать набор и хранить комплект для экстракции при комнатной температуре (до 25 °С). 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 реагентов, хранению не подлежит.

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

12. 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® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)» 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		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		Знаки опасности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Краткое руководство

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans, Epidermophyton floccosum, Microsporum canis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)»
по ТУ 21.20.23-183-09286667-2022

АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)

Форма выпуска 1

Методика амплификации

REF 2145-11

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ кожа и ее придатки (волосы и ногти).

ХРАНЕНИЕ ОЧИЩЕННОЙ ДНК

Температура	Длительность хранения
2 °C … 8 °C	7 дней
– 24 °C … – 16 °C	6 месяцев
– 68 °C	12 месяцев

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество	Заявление об опасности[1]
Комплект для экстракции				
Буфер L 	Прозрачная жидкость[2]	24,0	1 флакон	H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар, H302: Вредно при проглатывании, H311: Токсично при контакте с кожей, H319: Вызывает серьезное раздражение глаз, H332: Вредно при вдыхании, H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями, EUH032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.
Буфер M	Прозрачная жидкость	27,0	1 флакон	–
Буфер E	Прозрачная жидкость	77,0	1 флакон	–
МГС	Суспензия	1,10	1 пробирка	–
ВКО-FL	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
ОКО	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
Комплект для ПЦР				
ПЦР-смесь Дерматофиты	Прозрачная жидкость	1,20	1 пробирка	–
ПЦР-смесь *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	1,20	1 пробирка	–
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная жидкость	0,65	2 пробирки	–
ПКО Дерматофиты	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
ПКО *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.				

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2 °C … 8 °C в защищенном от света месте. При получении допускается разукомплектовать набор и хранить комплект для экстракции при комнатной температуре (до 25 °C). Не допускается замораживание реагентов.

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению набора	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство. Методика экстракции ДНК	в бумажном виде
Краткое руководство. Методика амплификации	в бумажном виде
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде

[1] **ВНИМАНИЕ!** При работе с набором следует соблюдать меры предосторожности, описанные в инструкции по применению набора.
[2] При хранении Буфера L возможно образование осадка в виде кристаллов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Дерматофиты / ПЦР-смеси *T. tonsurans*** и **ПЦР-буфера-Н**, требующиеся для приготовления 2-х реакционных смесей, согласно таблице ниже. Каждую смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Дерматофиты / ПЦР-смесь *T. tonsurans*	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Тестирование можно проводить, как одновременно на двух смесях для всех образцов, так и по отдельности (тестирование на ПЦР-смеси *T. tonsurans* целесообразно только для образцов положительных по каналу R6G ПЦР-смеси Дерматофиты). Возможно тестирование в разных реакционных блоках.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

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

2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок **ПЦР смесью Дерматофиты / ПЦР-смесью *T. tonsurans*** и **ПЦР буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционные смеси в 2-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленных реакционных смесей	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов (проба ДНК вносится в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью)
Пробы, экстрагированной из ОКО	в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью для образцов ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью для образцов К- (отрицательного контроля ПЦР)
ПКО Дерматофиты	в пробирку с ПЦР-смесью Дерматофиты для образца ПКО (положительного контроля ПЦР)
ПКО *T. tonsurans*	в пробирку с ПЦР-смесью *T. tonsurans* для образца ПКО (положительного контроля ПЦР)

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

6. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала:

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[3], ROX, Cy5, Cy5.5	

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечания:

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

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

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

9. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ 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.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) 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/;

– в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Краткое руководство

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans, Epidermophyton floccosum, Microsporum canis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)»
по ТУ 21.20.23-183-09286667-2022

АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)

Форма выпуска 1

Методика экстракции ДНК

REF 2145-11

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ кожа и ее придатки (волосы и ногти).

ХРАНЕНИЕ ОЧИЩЕННОЙ ДНК

Температура	Длительность хранения
2 °C … 8 °C	7 дней
– 24 °C … – 16 °C	6 месяцев
– 68 °C	12 месяцев

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество	Заявление об опасности[1]
Комплект для экстракции				
Буфер L 	Прозрачная жидкость[2]	24,0	1 флакон	H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар, H302: Вредно при проглатывании, H311: Токсично при контакте с кожей, H319: Вызывает серьезное раздражение глаз, H332: Вредно при вдыхании, H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями, EUH032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.
Буфер M	Прозрачная жидкость	27,0	1 флакон	–
Буфер E	Прозрачная жидкость	77,0	1 флакон	–
МГС	Суспензия	1,10	1 пробирка	–
ВКО-FL	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
ОКО	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
Комплект для ПЦР				
ПЦР-смесь Дерматофиты	Прозрачная жидкость	1,20	1 пробирка	–
ПЦР-смесь *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	1,20	1 пробирка	–
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная жидкость	0,65	2 пробирки	–
ПКО Дерматофиты	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
ПКО *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.				

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2 °C … 8 °C в защищенном от света месте. При получении допускается разукомплектовать набор и хранить комплект для экстракции при комнатной температуре (до 25 °C). Не допускается замораживание реагентов.

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению набора	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство. Методика экстракции ДНК	в бумажном виде
Краткое руководство. Методика амплификации	в бумажном виде
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде

[1] **ВНИМАНИЕ!** При работе с набором следует соблюдать меры предосторожности, описанные в инструкции по применению набора.
[2] При хранении Буфера L возможно образование осадка в виде кристаллов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

ВНИМАНИЕ! Перед экстракцией необходимо провести предобработку биоматериала.

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

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

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

4. Далее провести экстракцию в соответствии с методиками, указанными ниже.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИИ

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции НК необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации данной автоматической станции и запрограммировать последовательность действий, указанную ниже.

1. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования).

2. Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

3. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл или ячейку картриджа (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов, следующие реагенты/образцы:

Добавляемый реагент / образец		
При раздельном внесении ВКО-FL, МГС, Буфера L		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
МГС	10 мкл	в каждую пробирку
Буфер L	200 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС, Буфера L		
Смесь ВКО-FL, МГС и Буфера L	220 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля

4. Перемешать содержимое пробирок.

5. Прогреть пробирки при температуре **60 °С** в течение **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок.

6. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин**.

7. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

8. Добавить в пробирки по **500 мкл Буфера Е** и, не перемешивая, удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера Е содержимое пробирок не перемешивать.

9. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера Е**, перемешать.

10. Прогреть пробирки при температуре **60 °С** в течение **5 мин** с включенным перемешиванием.

11. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин**.

12. Вынуть магнитный стержень с силикой из пробирок или при использовании магнитного штатива перенести надосадочную жидкость в новую пробирку или плашку.

13. Элюат содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для хранения ДНК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РУЧНАЯ МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНОГО ШТАТИВА

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный (ОКО) контроль. Промаркировать.

2. Перемешать взбалтыванием **Буфер L** и **Буфер E**. Перемешать **ВКО-FL** и осадить капли на вортексе.

3. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

4. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь **ВКО-FL** и **МГС**, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL** и **10 мкл МГС**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание – Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную суспензию тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

5. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл для исследуемых и контрольных образцов, следующие реагенты/образцы:

Добавляемый реагент / образец		
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС		
Смесь ВКО-FL и МГС	20 мкл	в каждую пробирку
Буфер L	200 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС, Буфера L		
Смесь ВКО-FL, МГС и Буфера L	220 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля

6. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

7. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.

9. Без снятия пробирок с магнитного штатива, по внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

10. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в них по **500 мкл Буфера E**.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера E содержимое пробирок не перемешивать.

11. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 9.

12. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера E**, перемешать на вортексе.

13. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **5 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

14. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.

15. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК для проведения дальнейшего исследования осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для хранения ДНК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РУЧНАЯ МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный (ОКО) контроль. Промаркировать.

2. Перемешать взбалтыванием Буфер L и Буфер E. Перемешать ВКО-FL и осадить капли на вортексе.

3. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

4. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь **ВКО-FL** и **МГС**, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL** и **10 мкл МГС**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

5. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл, подготовленную для исследуемых и контрольных образцов, следующие реагенты/образцы:

Добавляемый реагент / образец		
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС		
Смесь ВКО-FL и МГС	20 мкл	в каждую пробирку
Буфер L	200 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС, Буфера L		
Смесь ВКО-FL, МГС и Буфера L	220 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля

6. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

7. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

9. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

10. Добавить в пробирки по **500 мкл Буфера E**.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера E содержимое пробирок не перемешивать.

11. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

12. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 9.

13. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера E**, перемешать на вортексе.

14. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

15. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

16. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

ВНИМАНИЕ! Внесение ДНК в реакцию необходимо провести незамедлительно после центрифугирования. Если в течение 3 мин после центрифугирования проба не внесена в реакцию, необходимо провести повторное центрифугирование.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для хранения ДНК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Краткое руководство

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans, Epidermophyton floccosum, Microsporum canis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)»
по ТУ 21.20.23-183-09286667-2022

АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)

Форма выпуска 2

Методика амплификации

REF P2145-12

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ кожа и ее придатки (волосы и ногти).

ХРАНЕНИЕ ОЧИЩЕННОЙ ДНК

Температура	Длительность хранения
2 °C … 8 °C	7 дней
– 24 °C … – 16 °C	6 месяцев
– 68 °C	12 месяцев

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество	Заявление об опасности[1]
Комплект для экстракции				
Буфер L 	Прозрачная жидкость[2]	24,0	1 флакон	H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар, H302: Вредно при проглатывании, H311: Токсично при контакте с кожей, H319: Вызывает серьезное раздражение глаз, H332: Вредно при вдыхании, H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями, EUH032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.
Буфер M	Прозрачная жидкость	27,0	1 флакон	–
Буфер E	Прозрачная жидкость	77,0	1 флакон	–
МГС	Суспензия	1,10	1 пробирка	–
ВКО-FL	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
ОКО	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
Комплект для ПЦР				
ПЦР-смесь Дерматофиты	Прозрачная жидкость	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[3]	–
ПЦР-смесь *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[3]	–
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость	1,20	2 пробирки	–
ПКО Дерматофиты	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
ПКО *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.				

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2 °C … 8 °C в защищенном от света месте. При получении допускается разукомплектовать набор и хранить комплект для экстракции при комнатной температуре (до 25 °C). Не допускается замораживание реагентов.

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению набора	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство. Методика экстракции ДНК	в бумажном виде
Краткое руководство. Методика амплификации	в бумажном виде
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде

[1] **ВНИМАНИЕ!** При работе с набором следует соблюдать меры предосторожности, описанные в инструкции по применению набора.
[2] При хранении Буфера L возможно образование осадка в виде кристаллов.
[3] Пустые пробирки не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество стрипов с **ПЦР-смесью Дерматофиты / ПЦР-смесью *T. tonsurans*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Тестирование можно проводить, как одновременно на двух смесях для всех образцов, так и по отдельности (тестирование на ПЦР-смеси *T. tonsurans* целесообразно только для образцов положительных по каналу R6G ПЦР-смеси Дерматофиты). Возможно тестирование в разных реакционных блоках.

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

3. Внести в подготовленные пробирки **ПЦР-буфер-К** и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфер-К	в пробирки с ПЦР-смесью Дерматофиты / ПЦР-смесью *T. tonsurans* **ВНИМАНИЕ!** ПЦР-буфер-К не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов (проба ДНК вносится в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью)
Пробы, экстрагированной из ОКО	в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью для образцов ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в 2 пробирки с каждой ПЦР-смесью для образцов К- (отрицательного контроля ПЦР)
ПКО Дерматофиты	в пробирку с ПЦР-смесью Дерматофиты для образца ПКО (положительного контроля ПЦР)
ПКО *T. tonsurans*	в пробирку с ПЦР-смесью *T. tonsurans* для образца ПКО (положительного контроля ПЦР)

4. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала:

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[4], ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечания:

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

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

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

7. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ 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.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) 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/;

– в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Краткое руководство

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes complex, Trichophyton tonsurans, Epidermophyton floccosum, Microsporum canis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)»
по ТУ 21.20.23-183-09286667-2022

АмплиПрайм® Дерматофиты (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*)

Форма выпуска 2

Методика экстракции ДНК

REF P2145-12

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ кожа и ее придатки (волосы и ногти).

ХРАНЕНИЕ ОЧИЩЕННОЙ ДНК

Температура	Длительность хранения
2 °C … 8 °C	7 дней
– 24 °C … – 16 °C	6 месяцев
– 68 °C	12 месяцев

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество	Заявление об опасности[1]
Комплект для экстракции				
Буфер L 	Прозрачная жидкость[2]	24,0	1 флакон	H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар, H302: Вредно при проглатывании, H311: Токсично при контакте с кожей, H319: Вызывает серьезное раздражение глаз, H332: Вредно при вдыхании, H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями, EUH032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.
Буфер M	Прозрачная жидкость	27,0	1 флакон	–
Буфер E	Прозрачная жидкость	77,0	1 флакон	–
МГС	Суспензия	1,10	1 пробирка	–
ВКО-FL	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
ОКО	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка	–
Комплект для ПЦР				
ПЦР-смесь Дерматофиты	Прозрачная жидкость	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[3]	–
ПЦР-смесь *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[3]	–
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость	1,20	2 пробирки	–
ПКО Дерматофиты	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
ПКО *T. tonsurans*	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка	–
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.				

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2 °C … 8 °C в защищенном от света месте. При получении допускается разукомплектовать набор и хранить комплект для экстракции при комнатной температуре (до 25 °C). Не допускается замораживание реагентов.

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению набора	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство. Методика экстракции ДНК	в бумажном виде
Краткое руководство. Методика амплификации	в бумажном виде
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде

[1] **ВНИМАНИЕ!** При работе с набором следует соблюдать меры предосторожности, описанные в инструкции по применению набора.
[2] При хранении Буфера L возможно образование осадка в виде кристаллов.
[3] Пустые пробирки не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

ВНИМАНИЕ! Перед экстракцией необходимо провести предобработку биоматериала.

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

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

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

4. Далее провести экстракцию в соответствии с методиками, указанными ниже.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИИ

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции НК необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации данной автоматической станции и запрограммировать последовательность действий, указанную ниже.

1. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования).

2. Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

3. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл или ячейку картриджа (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов, следующие реагенты/образцы:

Добавляемый реагент / образец		
При раздельном внесении ВКО-FL, МГС, Буфера L		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
МГС	10 мкл	в каждую пробирку
Буфер L	200 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС, Буфера L		
Смесь ВКО-FL, МГС и Буфера L	220 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля

4. Перемешать содержимое пробирок.

5. Прогреть пробирки при температуре **60 °С** в течение **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок.

6. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин**.

7. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

8. Добавить в пробирки по **500 мкл Буфера Е** и, не перемешивая, удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера Е содержимое пробирок не перемешивать.

9. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера Е**, перемешать.

10. Прогреть пробирки при температуре **60 °С** в течение **5 мин** с включенным перемешиванием.

11. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин**.

12. Вынуть магнитный стержень с силикой из пробирок или при использовании магнитного штатива перенести надосадочную жидкость в новую пробирку или плашку.

13. Элюат содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для хранения ДНК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РУЧНАЯ МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНОГО ШТАТИВА

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный (ОКО) контроль. Промаркировать.

2. Перемешать взбалтыванием **Буфер L** и **Буфер E**. Перемешать **ВКО-FL** и осадить капли на вортексе.

3. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

4. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь **ВКО-FL** и **МГС**, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL** и **10 мкл МГС**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание – Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную суспензию тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

5. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл для исследуемых и контрольных образцов, следующие реагенты/образцы:

Добавляемый реагент / образец		
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС		
Смесь ВКО-FL и МГС	20 мкл	в каждую пробирку
Буфер L	200 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС, Буфера L		
Смесь ВКО-FL, МГС и Буфера L	220 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля

6. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

7. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.

9. Без снятия пробирок с магнитного штатива, по внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

10. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в них по **500 мкл Буфера E**.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера E содержимое пробирок не перемешивать.

11. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 9.

12. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера E**, перемешать на вортексе.

13. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **5 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

14. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.

15. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК для проведения дальнейшего исследования осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для хранения ДНК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РУЧНАЯ МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный (ОКО) контроль. Промаркировать.

2. Перемешать взбалтыванием Буфер L и Буфер E. Перемешать ВКО-FL и осадить капли на вортексе.

3. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

4. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь **ВКО-FL** и **МГС**, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL** и **10 мкл МГС**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с **ВКО-FL** и **МГС** в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 25 °С.

5. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл, подготовленную для исследуемых и контрольных образцов, следующие реагенты/образцы:

Добавляемый реагент / образец		
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС		
Смесь ВКО-FL и МГС	20 мкл	в каждую пробирку
Буфер L	200 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля
При внесении предварительно подготовленной смеси ВКО-FL, МГС, Буфера L		
Смесь ВКО-FL, МГС и Буфера L	220 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для отрицательного контроля

6. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

7. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

9. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

10. Добавить в пробирки по **500 мкл Буфера E**.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера E содержимое пробирок не перемешивать.

11. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

12. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 9.

13. Добавить в пробирки **100 мкл Буфера E**, перемешать на вортексе.

14. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

15. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

16. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

ВНИМАНИЕ! Внесение ДНК в реакцию необходимо провести незамедлительно после центрифугирования. Если в течение 3 мин после центрифугирования проба не внесена в реакцию, необходимо провести повторное центрифугирование.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для хранения ДНК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru