



В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов МикозоРезиста *Trichophyton* в фасовке S. Перед началом работы изучите инструкцию.

**Набор реагентов для выявления ДНК грибов рода *Trichophyton*  
с идентификацией вида *Trichophyton mentagrophytes* var. *indotinea*  
и мутаций в гене *ERG1*, определяющих резистентность  
к антимикотическим препаратам,  
методом ПЦР в режиме реального времени  
МикозоРезиста *Trichophyton***

**REF** R1-P038-S3/4 (Фасовка S, стрипы)

**Информация о наборе реагентов**

**Назначение:**

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК грибов рода *Trichophyton* с идентификацией вида *Trichophyton mentagrophytes* var. *indotinea* и выявления мутаций в гене *ERG1* (Phe397Leu, Leu393Ser, Leu393Phe, Ser436Ala, His440Tyr, Ala448Thr), определяющих резистентность к антимикотическим препаратам, в биологическом материале человека (кожа и её придатки: волосы и ногти), методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

**Выделение ДНК:**

Реагент ПРОБА-ДЕРМ (ООО «ДНК-Технология ТС»).

**Специализированное оборудование:**

Детектирующие амплификаторы планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированные в установленном порядке в РФ, например, детектирующие амплификаторы «ДТпрайм»<sup>1</sup>, «ДТпрайм II»<sup>1</sup> и «ДТлайт»<sup>2</sup> (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFХ96 (Био-Рад Лабораториз, Инк).

**Количество анализируемых образцов:**

48 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

**Состав набора реагентов:**

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная, розовая или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец №1 <sup>3</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	320 мкл
Положительный контрольный образец №2 <sup>4</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	320 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

Т а б л и ц а 1 – Выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки в стрипе	Каналы детекции				Цветовая маркировка смеси для амплификации
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1,5	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>indotinea</i>	ВК	<i>Trichophyton</i> spp.	-	Голубая
2,6	Phe397Leu	ВК	-	Leu393Phe	Бесцветная или розовая
3,7	His440Tyr	ВК	Leu393Ser	-	
4,8	Ser436Ala	ВК	Ala448Thr	Маркер	

<sup>1</sup> – модификация \*М\*

<sup>2</sup> – модификация \*S\*

<sup>3</sup> – на этикетке компонента «Положительный контрольный образец №1» указывается как «К+ №1»

<sup>4</sup> – на этикетке компонента «Положительный контрольный образец №2» указывается как «К+ №2»

## Проведение анализа

### 1 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

#### ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. Следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

1.1 Промаркируйте по 4 стрипованные пробирки со смесями для амплификации, запечатанными парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-), для положительного контрольного образца №1 (К+ №1) и для положительного контрольного образца №2 (К+ №2) (таблица 2).

**ВНИМАНИЕ!** Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 2 положительных контрольных образцов в каждой постановке.

Примечания:

1. Один стрип рассчитан на исследование двух образцов.
2. Допускается использовать 2 положительных контрольных образца (К+ №1 и К+ №2) в первой постановке, а для дальнейших постановок с той же серией набора реагентов – только К+ №1.

Таблица 2 – Пример маркировки пробирок для исследования 2 неизвестных образцов

Анализируемые образцы	Маркировка пробирок в стрипе
Неизвестный образец №1	Стрип №1, пробирки 1–4
Неизвестный образец №2	Стрип №1, пробирки 5–8
«К-»	Стрип №2, пробирки 1–4
«К+ №1»	Стрип №2, пробирки 5–8
«К+ №2»	Стрип №3, пробирки 1–4

1.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.

1.3 Добавьте в каждую пробирку промаркированных стрипов (включая «К-», «К+ №1» и «К+ №2»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

1.4 Добавьте в каждую пробирку промаркированных стрипов по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте стрипы крышками.

1.5 Встряхните пробирки с положительными контрольными образцами на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.

#### ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению реагента ПРОБА-ДЕРМ.

2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Необходимо закрывать стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

1.6 Внесите в соответствующие промаркированные стрипованные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-», «К+ №1» и «К+ №2», ДНК не вносится.

1.7 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К-», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

1.8 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К+ №1», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца №1.

1.9 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К+ №2», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца №2.

1.10 Центрифугируйте все стрипы на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.

1.11 Установите все стрипы в детектирующий амплификатор.

#### 1.12 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест<sup>1</sup>. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см.1.11) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

#### 1.13 Для детектирующих амплификаторов CFX96:

Проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 4.

<sup>1</sup> – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А инструкции по применению) или предоставляется производителем набора реагентов

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» и «ДТлайт»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 <sup>1</sup>	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Т а б л и ц а 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °С	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	00:15	50
4	64 √	00:20	

√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex, Rox, Cy5) при 64 °С

**2 Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводятся автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.

При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Setting» необходимо выбрать «Baseline Subtracted Curve Fit».

Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 5. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

### Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

Смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

### Символы, используемые при маркировке набора реагентов

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Номер по каталогу
	Температурный диапазон		Изготовитель
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Не допускать воздействия солнечного света
	Использовать до		Нестерильно
	Код партии (серии)		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Дата изготовления		

<sup>1</sup> – допускается хранение при температуре 10 °С

Т а б л и ц а 5 – Интерпретация результатов ПЦР

№ пробирке в стрипе	Канал детекции				Интерпретация результата
	Fam, Cp/Cq	Hex, Cp/Cq	Rox, Cp/Cq	Cy5, Cp/Cq	
<b>Неизвестные образцы</b>					
1,5	≤35	Не учитывается	<b>Указан</b>	Не указан	<b>Обнаружена ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>indotinea</i></b>
	>35	Не учитывается	<b>Указан</b>	Не указан	<b>Обнаружена ДНК <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>indotinea</i>, но ДНК недостаточно для определения наличия мутаций в гене <i>ERG1</i><sup>1</sup></b>
	Не указан	Не учитывается	≤35	Не указан	<b>Обнаружена ДНК <i>Trichophyton</i> spp.</b>
	Не указан	Не учитывается	>35	Не указан	<b>Обнаружена ДНК <i>Trichophyton</i> spp., но ДНК недостаточно для определения наличия мутаций в гене <i>ERG1</i><sup>1</sup></b>
	<b>Указан</b>	Не учитывается	Не указан	Не указан	Недостовверный результат
2,6	<b>Указан</b>	Не учитывается	Не указан	Не указан	<b>Обнаружена замена Phe397Leu</b>
	Не указан	Не учитывается	Не указан	<b>Указан</b>	<b>Обнаружена замена Leu393Phe</b>
3,7	<b>Указан</b>	Не учитывается	Не указан	Не указан	<b>Обнаружена замена His440Tyr</b>
	Не указан	Не учитывается	<b>Указан</b>	Не указан	<b>Обнаружена замена Leu393Ser</b>
4,8	<b>Указан</b>	Не учитывается	Не указан	Не указан	<b>Обнаружена замена Ser436Ala</b>
	Не указан	Не учитывается	<b>Указан</b>	Не указан	<b>Обнаружена замена Ala448Thr</b>
<b>Для всех пробирок</b>	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	Не обнаружена ДНК определяемых микроорганизмов, не обнаружены мутации в гене <i>ERG1</i>
	Не указан	Не указан	Не указан	Не указан	Недостовверный результат
<b>Отрицательный контрольный образец</b>					
1,5	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	<b>Отрицательный результат</b> Результаты постановки валидны
2,6	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	
3,7	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	
4,8	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	
<b>Положительный контрольный образец №1</b>					
1,5	<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	Не указан	<b>Положительный результат</b> Результаты постановки валидны
2,6	<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	
3,7	<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	Не указан	
4,8	Не указан	<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	Не указан	
<b>Положительный контрольный образец №2</b>					
1,5	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	<b>Положительный результат</b> Результаты постановки валидны
2,6	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	<b>Указан</b>	
3,7	Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	
4,8	<b>Указан</b>	<b>Указан</b>	Не указан	Не указан	

Номер 1227  
2026-01-28

<sup>1</sup> – низкое количество ДНК (Cp >35) может обусловить ложноотрицательный результат при определении мутаций ERG1