
« ____ » _____ 2020 г.
Погода А.А.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из
клинических образцов «ФБиоНуклео» по ТУ 21.20.23-001-83881765-2020 в
вариантах исполнения.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «ФБиоНуклео» по ТУ 21.20.23-001-83881765-2020 в вариантах исполнения предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из клинического материала человека (плазма крови с антикоагулянтами К₂ЭДТА, К₃ЭДТА, гепарином и цитратом натрия, сыворотка крови, мокрота, моча, слюна, ликвор, эякулят, секрет предстательной железы, мазки и смывы из полости носа и ротоглотки, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, соскобы эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, прямой кишки и фекалии и др.) методом полимеразной цепной реакции. Получаемый образец пригоден для диагностики с применением методов амплификации нуклеиновых кислот.

1.2 Выделение ДНК и РНК — важный шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие приложения, такие как полимеразная цепная реакция, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, клонирование, сиквенс, гибридизация, синтез ДНК и т. д., не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот.

1.3. Окончательный диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

1.4. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

1.5. Область применения - клиническая лабораторная диагностика. Потенциальным потребителем является медицинский персонал клиничко-диагностических лабораторий.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

2.1 Принцип действия

В растворе, содержащем хаотропную соль – гуанидин тиоционат, происходит лизис клеточных систем и денатурация белков. При высокой концентрации соли нуклеиновые кислоты связываются с силикатной мембраной. После удаления соли этанол-содержащим буфером осуществляется отмывка нуклеиновых кислот от солей и ингибиторов.

Противопоказанием к применению набора является нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, не соблюдение требований инструкции.

Внимание! В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов. Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

2.2. В состав набора входят:

- Центрифужные колонки с собирающими пробирками;
- Собирающие пробирки;
- Буфер ПГ (лизирующий буфер);
- Буфер ОБ (осаждающий буфер);
- Буфер П1 (промывочный буфер);

- Буфер П2 (промывочный буфер);
- Буфер П3 (промывочный буфер);
- Буфер ЕБ (элюирующий буфер);
- Инструкция по применению.

Набор выпускается в 4 вариантах исполнения:

Комплект 1 (Кат. № НК-1-50+):

- Центрифужные колонки с собирающими пробирками – 1 упаковка 50 шт;
- Собирающие пробирки – 1 упаковка 50 шт;
- Буфер ПГ – 1 флакон 17,5 мл;
- Буфер ОБ – 1 флакон 25 мл;
- Буфер П1 – 1 флакон 24 мл;
- Буфер П2 – 1 флакон 8,75 мл;
- Буфер П3 – 1 флакон 8,75 мл;
- Буфер ЕБ – 1 флакон 13 мл;
- Инструкция по применению.

Комплект 2 (Кат. № НК-1- 100+):

- Центрифужные колонки с собирающими пробирками – 2 упаковки по 50 шт;
- Собирающие пробирки – 2 упаковки по 50 шт;
- Буфер ПГ – 1 флакон 37 мл;
- Буфер ОБ – 1 флакон 50 мл;
- Буфер П1 – 1 флакон 48 мл;
- Буфер П2 – 1 флакон 17.5 мл;
- Буфер П3 – 1 флакон 17,5 мл;
- Буфер ЕБ – 1 флакон 30 мл;
- Инструкция по применению.

- Комплект 3 (Кат. № НК-1-50):

- Центрифужные колонки с собирающими пробирками – 1 упаковка 50 шт;
- Буфер ПГ – 1 флакон 17,5 мл;
- Буфер ОБ – 1 флакон 25 мл;
- Буфер П1 – 1 флакон 24 мл;
- Буфер П2 – 1 флакон 8,75 мл;
- Буфер П3 – 1 флакон 8,75 мл;
- Буфер ЕБ – 1 флакон 13 мл;
- Инструкция по применению.

- Комплект 4 (Кат. № НК-1-100):

- Центрифужные колонки с собирающими пробирками – 2 упаковки по 50 шт;
- Буфер ПГ – 1 флакон 37 мл;
- Буфер ОБ – 1 флакон 50 мл;
- Буфер П1 – 1 флакон 48 мл;
- Буфер П2 – 1 флакон 17.5 мл;
- Буфер П3 – 1 флакон 17,5 мл;
- Буфер ЕБ – 1 флакон 30 мл;
- Инструкция по применению.

2.3 В состав реагентов входят:

Буфер ПГ:

Гуанидин тиоцианат;
Ацетатный буфер.

Буфер ОБ:

Натрий хлористый.

Буфер П1:

Трис солянокислый;

Гуанидин гидрохлорид.

Буфер П2:

Натрий хлористый;

Трис солянокислый.

Буфер П3:

Натрий хлористый;

Трис солянокислый.

Буфер ЕБ:

Трис солянокислый.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность выявления ДНК *Giardia lamblia* определяется по восьми образцам положительных биопроб стандартного образца предприятия, СОП ГЛ (СОП 02-1), с содержанием ДНК *Giardia lamblia* 100 копий в пробе – 100%.

3.2. Аналитическая специфичность выявления ДНК *Giardia lamblia* определяется по восьми образцам биопроб стандартного образца предприятия, не содержащих ДНК *Giardia lamblia* СОП ГЛ (СОП 02-1) - 100%.

3.3. Аналитическая чувствительность выделения РНК определяется по шести образцам положительных биопроб стандартного образца предприятия, СОП ГА (СОП 03-1), с содержанием РНК вируса гриппа А ~500 копий в 1 мл – 100%.

3.4. Аналитическая специфичность выделения РНК определяется по шести образцам отрицательных биопроб стандартного образца предприятия, СОП ГА (СОП 03-1) - 100%.

Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность зависят от характеристик тест-специфичного набора.

Полученный результат не может использоваться в качестве единственного показателя для диагностики заболеваний, но используется в сочетании с другими лабораторными показателями и другой диагностической информацией.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2 Все компоненты набора, используемые согласно инструкции, являются нетоксичными и не имеют контакта с организмом человека.

4.3 При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и методических указаниях МУ 287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.14.1998 г.). Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4 При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки, так как клинические образцы человека следует рассматривать как потенциально инфекционные,

способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5 Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6 Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7 Набор не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого, животного происхождения. Набор не содержит веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным или влияющим на репродуктивную деятельность человека действием. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

4.8. Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

4.9 К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с реагентами требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор с детекцией в режиме реального времени, например, «ДТ-ПРАЙМ» производства ООО «НПО-ДНК-Технология»;
- микроцентрифуга, на 13000 об./мин., например, Eppendorf Centrifuge серии 54xx производства Eppendorf AG (Германия);
- набор одноканальных дозаторов с переменным объёмом, например, Eppendorf research Plus производства Eppendorf AG (Германия);
- штативы для наконечников и микропробирок;
- одноразовые наконечники с фильтрами для дозаторов;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки объёмом 1,5 – 2,0 мл;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки объёмом 0,2 мл;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованного расходного материала;
- набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов («ФБиоНуклео»), производства ООО «Фрактал Био» или аналогичный (см. п. 2.2. инструкции по применению);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (ГОСТ Р 52239-2004);
- спирт этиловый ректификованный 96% (ГОСТ 18300-87).

6. ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

Плазма крови с антикоагулянтами К₂ЭДТА, К₃ЭДТА, гепарином и цитратом натрия, сыворотка крови, мокрота, моча, слюна, ликвор, эякулят, секрет предстательной железы, мазки и смывы из полости носа и ротоглотки, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, соскобы эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, прямой кишки и фекалии и др.

Процедура взятия клинического материала проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» и в соответствии с инструкцией к тест-специфичному набору.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Предварительные действия.

7.1.1 Перед использованием проверить лизирующий буфер (ПГ) на наличие осадка. Если осадок образовался, необходимо его растворить нагреванием буфера до 37°C и перемешиванием непосредственно перед использованием.

7.1.2 Убедитесь, что все буферы и центрифужные колонки имеют при использовании комнатную температуру.

7.1.3 Рекомендуется проводить отрицательный контроль – выделение из воды, и использовать его при последующих постановках обратной транскрипции и ПЦР.

7.1.4 Добавьте по 16,25 мл (50 выделений) или по 32,5 мл (100 выделений) этанола (96%) во флаконы с буферами П2 и П3 из состава набора «ФБиоНуклео» перед первым их использованием, поставьте галочки на крышке флаконов. Полученные буферы хранятся в закрытом виде и при температуре +18...23°C в течение всего срока годности.

Примечание. Центрифугирование на каждом этапе выделения осуществляется в микроцентрифуге на 13000 об/мин (17900g) при комнатной температуре.

7.2 Непосредственно выделение.

7.2.1 Добавьте 350 мкл лизирующего буфера (ПГ) к 100 мкл пробы или к 50 мкл крови. Тщательно перемешать при помощи вортекса.

Инкубировать пробирки со смесью 5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая на вортексе.

7.2.2 Добавьте в пробирку 500 мкл осаждающего буфера (ОБ). Тщательно перемешать. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

Примечание. Полученные на этом этапе материалы допускается хранить сутки при комнатной температуре и продолжить выделение позже.

Проведите центрифугирование в течение 5 минут при 13000 об/мин.

7.2.3 С помощью пипетки перенесите 700 мкл супернатанта на центрифужную колонку из состава набора.

Внимание! Избегайте взбалтывания и переноса осадка!

Провести центрифугирование в течение 1 минуты.

Удалите центрифугат из пробирки и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.

7.2.4 Добавьте 450 мкл промывочного буфера (П1) на центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 1 минуты. Удалите центрифугат из пробирки и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.

Внимание! Убедитесь, что в промывочные буферы (П2 и П3) добавлен этанол.

7.2.5 Добавьте 450 мкл промывочного буфера (П2) на центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 1 минуты. Удалите центрифугат из пробирки и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.

7.2.6 Добавьте 450 мкл промывочного буфера (П3) на центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 1 минуты. Удалите центрифугат из пробирки и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.

Проведите дополнительное центрифугирование в течение 1 минуты для удаления остатков буферного раствора и этанола.

7.2.7 Для комплекта 1 (Кат. № НК-1-50+) и комплекта 2 (Кат. № НК-1-100+) перенести колонку в чистую собирающую пробирку из состава набора. Для элюирования нуклеиновых кислот добавить 100 мкл буфера ЕБ из набора реагентов «ФБиоНуклео» в центр мембраны колонки для полной элюции связанной нуклеиновой кислоты и проведите центрифугирование в течение 1 минуты.

7.2.8 Для комплекта 3 (Кат. № НК-1-50) и комплекта 4 (Кат. № НК-1-100) поместить колонку на чистую одноразовую полипропиленовую микропробирку объёмом 1,5-2 мл. Для элюирования нуклеиновых кислот добавить 100 мкл буфера ЕБ из набора реагентов «ФБиоНуклео» в центр мембраны колонки для полной элюции связанной нуклеиновой кислоты и проведите центрифугирование в течение 1 минуты.

Полученный центрифугат использовать для анализа выделенных нуклеиновых кислот методом ПЦР.

Вниманине! Для полной элюции связанной нуклеиновой кислоты убедитесь, что буфер ЕБ наносится точно на мембрану. Избегайте контакта наконечника пипетки с мембраной.

Примечание Объём буфера ЕБ для элюции можно варьировать от 15 до 200 мкл в зависимости от поставленной задачи.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

8.1. Транспортирование.

8.1.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от плюс 18°C до плюс 23°C. Допускается транспортировка при температуре до плюс 8°C не более 7 суток.

8.1.2. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

8.2. Хранение.

8.2.1 Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от плюс 18°C до плюс 23°C в течение всего срока годности.

Срок годности набора - 12 месяцев.

Срок годности вскрытых компонентов набора – 12 месяцев.

Срок годности приготовленных для работы компонентов – в течение всего срока годности.

Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных серий набора «ФБиоНуклео»,

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

8.2.2 Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

8.3. Эксплуатация.

8.3.1 При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- не использовать Набор после окончания срока годности.
- не использовать Набор реагентов, если упаковка повреждена.
- использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
- после использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.3.2. Все компоненты Набора реагентов при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности. Не используйте Набор с истекшим сроком годности. Срок годности набора указан на внешней стороне упаковки.

8.3.3 Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры постановки анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

8.4. Утилизация.

8.4.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

8.4.2. При использовании набора образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 4.1.8.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

8.4.3. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

9. ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ.

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «ФБиоНуклео» по ТУ 21.20.23-001-83881765-2020 в вариантах исполнения соответствует требованиям: ГОСТ Р 51352-2013; ГОСТ Р 51088-2013; ГОСТ Р ИСО 23640-2015; ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015; ГОСТ Р ЕН 13612-2010; ГОСТ ISO 18153-2011; ГОСТ ISO 14971-2011; ГОСТ ISO 17511-2011; ГОСТ Р 15.013-2016; ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

10.4. Основаниями для рекламации являются: отсутствие активности, неспецифичность реагентов, нарушение целостности флакона, недостаточные сведения. При составлении рекламации необходимо указать дату получения, номер серии, причины, по которым реагент признан негодным. Вместе с рекламацией направляют образцы данной серии реагентов или расходных материалов и протокол с результатами проверки. Рекламацию следует направить на предприятие-изготовитель.

По вопросам качества Набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «ФБиоНуклео» ТУ 21.20.23-001-83881765-2020 в вариантах исполнения просьба обращаться на предприятие-изготовитель: ООО «Фрактал Био», 190020, г. Санкт-Петербург, ул. Бумажная, д. 17, тел/факс (812) 495-96-95, quality@fractalbio.com.

Генеральный директор
« ____ » _____ 2020 г

Погода А.А.