

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ООО «Медико-биологический Союз»

М.В. Лосев

« 13 » Апрель 2018 г.



ИНСТРУКЦИЯ по применению

«Инвитролоджик Описторхоз ДНК-скрин»

набор реагентов для качественного суммарного выявления ДНК *Opisthorchis felinus*,
Opisthorchis viverrini, *Metorchis bilis*, *Clonorchis sinensis* методом полимеразной
цепной реакции в режиме реального времени
по ТУ 9398-059-26329720-2016

НАЗНАЧЕНИЕ

Для диагностики «in vitro».

«Инвитролоджик Описторхоз ДНК-скрин» набор реагентов для качественного суммарного выявления ДНК *Opisthorchis felinus*, *Opisthorchis viverrini*, *Metorchis bilis*, *Clonorchis sinensis* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 9398-059-26329720-2016» (далее по тексту – набор реагентов), предназначенный для качественного суммарного выявления ДНК описторхид (*Opisthorchis felinus*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, *Metorchis bilis*) в образцах кала или желчи человека (далее по тексту – анализируемые образцы) методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (далее по тексту – ПЦРРВ).

Набор реагентов одновременно выявляет ДНК *Opisthorchis felinus*, *Opisthorchis viverrini*, *Metorchis bilis*, *Clonorchis sinensis*, не подразделяя их, не зависимо от популяционных и демографических аспектах применения набора реагентов.

Рекомендуется использовать для скрининга (первичной лабораторной диагностики) описторхоза¹.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Только для профессионального использования.

Сотрудники клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1 Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускают в виде комплекта 1 и комплекта 2.

Комплект 1 и комплект 2 предназначены для ручной постановки анализа.

Состав комплектов представлен в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 – Состав набора реагентов

Наименование	Количество	
	комплект 1 кат. №	комплект 2 кат. №
<i>Компоненты</i>		
«ЛБ-1» – лизирующий буферный раствор № 1 – прозрачная бесцветная жидкость	4 фл. (по 13,0 мл)	4 фл. (по 13,0 мл)

¹ Описторхоз – заболевание, вызванное инвазией описторхид (в рамках настоящего набора реагентов имеется ввиду одним из следующих видов или комбинацией следующих видов *Opisthorchis felinus* (O.felinus), *Opisthorchis viverrini* (O.viverrini), *Clonorchis sinensis* (C.sinensis), *Metorchis bilis* (M.bilis)).

«ЛБ-2» – лизирующий буферный раствор №2 – суспензия коричнево-черных магнитных частиц в прозрачной бесцветной жидкости	4 фл. (по 8,5 мл)	4 фл. (по 8,5 мл)
«ОБ» – осаждающий буферный раствор – прозрачная бесцветная жидкость	4 фл. (по 5,0 мл)	4 фл. (по 5,0 мл)
«ПР-1» – промывочный раствор №1 – прозрачная бесцветная жидкость	4 фл. (по 7,0 мл)	4 фл. (по 7,0 мл)
«ПР-2» – промывочный раствор №2 – прозрачная бесцветная жидкость	4 фл. (по 2,0 мл)	4 фл. (по 2,0 мл)
«ЭР» – элюирующий раствор – прозрачная бесцветная жидкость. Консерванты: проклин 300 - 0,1 %	4 фл. (по 1,0 мл)	4 фл. (по 1,0 мл)
«ОКО» – отрицательный контрольный образец – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (0,5 мл)
«ПКО» – положительный контрольный образец – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (0,5 мл)
«ВКО» – внутренний контрольный образец – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (1,5 мл)	1 фл. (1,5 мл)
«ГРС» – готовая реакционная смесь – лиофилизированная аморфная масса белого цвета в виде таблетки или порошка	1 пакет (48 пробирок)	1 пакет (48 стриппированных пробирок)
<i>Эксплуатационная документация</i>		
Инструкция по применению набора реагентов	1 шт.	1 шт.

2 Число анализируемых образцов биологического материала

Набор реагентов предназначен для выполнения 48 определений (комплект 1 и комплект 2), включая контрольные образцы.

3 Принцип метода

Метод определения основан на полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Выявление ДНК описторхид включает в себя две стадии: экстракцию ДНК описторхид из анализируемых образцов и циклическую амплификацию фрагментов ДНК описторхид с помощью специфических к этому участку праймеров и Taq ДНК-полимеразы с последующим определением накопления специфического флуоресцентного сигнала на амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Для контроля анализа в наборе реагентов предусмотрены контрольные образцы: «ОКО», «ПКО» и «ВКО». «ВКО» добавляют в анализируемый образец, где он одновременно с анализируемым образцом проходит все стадии анализа.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1 Чувствительность

Чувствительность набора реагентов определяли в ходе исследований с использованием следующих материалов:

– рабочей панели «РП ДНК(+/-)Описторхи», аттестованной Отделом биологического и технологического контроля (далее по тексту – ОБТК) ООО «Медико-биологический Союз». Чувствительность набора реагентов с образцами панели без ложноотрицательных результатов составила 100 %.

Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность набора реагентов определяли в ходе клинических исследований с использованием следующих материалов:

- массива образцов кала от пациентов с диагнозом Описторхоз в количестве 3200 образцов. Значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью $C = 95\%$ составляет 99,9 %;

- массива образцов желчи от пациентов с диагнозом Описторхоз в количестве 3200 образцов. Значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью $C = 95\%$ составляет 99,9 %.

2 Специфичность

Специфичность набора реагентов определяли в ходе исследований с использованием следующих материалов:

– рабочей панели «РП ДНК(+/-)Описторхи», аттестованной ОБТК ООО «Медико-биологический Союз». Специфичность набора реагентов с образцами панели без ложноположительных результатов составила 100 %.

Аналитическая специфичность

Показано отсутствие активности компонентов набора реагентов в отношении следующих паразитов: *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura*.

Диагностическая специфичность

Диагностическую специфичность набора реагентов определяли в ходе клинических исследований с использованием следующих материалов:

– массива образцов кала от здоровых доноров в количестве 12200 образцов. Значение диагностической специфичности с доверительной вероятностью $C = 95\%$ составляет 99,98% (~100 %);

– массива образцов желчи от здоровых доноров в количестве 12200 образцов. Значение диагностической специфичности с доверительной вероятностью $C = 95\%$ составляет 99,98% (~100 %).

3 Воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе клинических исследований с использованием трех положительных образцов в 15 повторях на наборах реагентов одной серии. Коэффициент вариации не превысил 8 %.

Межсерийная воспроизводимость анализа была протестирована с использованием трех положительных образцов на 10 сериях набора реагентов. Коэффициент вариации не превысил 8 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2Б (Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012 г.).

При работе с набором реагентов соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Утв. МЗ СССР 17 января 1991 г.) и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Гуанидина гидрохлорид, входящий в состав «ЛБ-1», «ЛБ-2», «ОКО», «ПКО», «ВКО», обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые.

«ЭР» содержит в качестве консерванта 0,1 % проклин 300.

«ОБ» содержит изопропанол. Не проводить работы с «ОБ» в непосредственной близости от открытого огня.

Все реактивы, входящие в состав компонентов набора реагентов в используемых концентрациях, являются нетоксичными. При попадании данных растворов на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Обеззараживание и/или обезвреживание и утилизацию всех анализируемых образцов, компонентов и отходов набора реагентов, несущих потенциальную биологическую опасность, производить в соответствии с разделом «Утилизация набора реагентов» настоящей инструкции по применению.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором реагентов необходимо следующее оборудование:

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (далее по тексту - амплификатор);
- бокс абактериальной воздушной среды 2-го класса биологической защиты (далее по тексту – ПЦР-бокс);
- холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С, и/или холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температуру до минус 20 °С.
- микроцентрифуга с максимальной частотой вращения не ниже 13 000 об/мин;
- встряхиватель для пробирок (далее по тексту - встряхиватель);
- термошейкер для пробирок вместимостью от 1,5 до 2,0 мл, поддерживающий температуру 65 °С, с частотой вращения платформы 1200 об/мин;
- весы, позволяющие взвешивать образцы массой до 1 г с точностью 10 мг;
- таймер/часы;
- одноканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %.

Для работы с набором реагентов необходимы следующие материалы:

- одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером;
- одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов пипеточных;
- шпатель для внесения образцов кала;
- пробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью от 1,5 до 2,0 мл;
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 и 2,0 мл;
- магнитный штатив для микропробирок вместимостью от 1,5 до 2,0 мл;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные;
- нарукавники одноразовые;
- контейнер для сбора и обеззараживания наконечников.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Идентификацию и прослеживаемость анализируемых образцов (проб пациента) проводить в соответствии с системой менеджмента качества лаборатории.

Для анализа использовать анализируемые образцы как свежезабранные, так и хранившиеся не более семи суток при температуре от 2 до 8 °С или не более шести месяцев при температуре минус 20 °С.

Подготовить анализируемые образцы, хранившиеся в холодильнике/морозильной камере, для анализа. Образцы, хранившиеся в морозильной камере, разморозить. Каждый анализируемый образец, хранившийся в холодильнике/морозильной камере, прогреть до температуры от 17 до 27 °С и тщательно перемешать.

Масса образца кала человека, необходимая для проведения анализа, должна составлять не менее 150 мг, объем образца желчи человека - не менее 500 мкл.

Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

ПРИЧИНЫ СНИЖЕНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦРРВ

Использование компонентов с истекшим сроком годности.

Использование компонентов из наборов реагентов разных серий производства ООО «Медико-биологический Союз» или смешивание их в процессе приготовления растворов.

Использование компонентов из наборов реагентов других производителей наборов реагентов.

Несоблюдение условий и сроков хранения вскрытых компонентов в случае частичной постановки анализа.

Использование для приготовления растворов грязной посуды.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором реагентов необходимо следующее оборудование:

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (далее по тексту - амплификатор);
- бокс абактериальной воздушной среды 2-го класса биологической защиты (далее по тексту – ПЦР-бокс);
- холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С, и/или холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температуру до минус 20 °С.
- микроцентрифуга с максимальной частотой вращения не ниже 13 000 об/мин;
- встряхиватель для пробирок (далее по тексту - встряхиватель);
- термощейкер для пробирок вместимостью от 1,5 до 2,0 мл, поддерживающий температуру 65 °С, с частотой вращения платформы 1200 об/мин;
- весы, позволяющие взвешивать образцы массой до 1 г с точностью 10 мг;
- таймер/часы;
- одноканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %.

Для работы с набором реагентов необходимы следующие материалы:

- одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером;
- одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов пипеточных;
- шпатель для внесения образцов кала;
- пробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью от 1,5 до 2,0 мл;
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 и 2,0 мл;
- магнитный штатив для микропробирок вместимостью от 1,5 до 2,0 мл;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные;
- нарукавники одноразовые;
- контейнер для сбора и обеззараживания наконечников.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Идентификацию и прослеживаемость анализируемых образцов (проб пациента) проводить в соответствии с системой менеджмента качества лаборатории.

Для анализа использовать анализируемые образцы как свежесобранные, так и хранившиеся не более семи суток при температуре от 2 до 8 °С или не более шести месяцев при температуре минус 20 °С.

Подготовить анализируемые образцы, хранившиеся в холодильнике/морозильной камере, для анализа. Образцы, хранившиеся в морозильной камере, разморозить. Каждый анализируемый образец, хранившийся в холодильнике/морозильной камере, прогреть до температуры от 17 до 27 °С и тщательно перемешать.

Масса образца кала человека, необходимая для проведения анализа, должна составлять не менее 150 мг, объем образца желчи человека - не менее 500 мкл.

Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

ПРИЧИНЫ СНИЖЕНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦРРВ

Использование компонентов с истекшим сроком годности.

Использование компонентов из наборов реагентов разных серий производства ООО «Медико-биологический Союз» или смешивание их в процессе приготовления растворов.

Использование компонентов из наборов реагентов других производителей наборов реагентов.

Несоблюдение условий и сроков хранения вскрытых компонентов в случае частичной постановки анализа.

Использование для приготовления растворов грязной посуды.

Несоблюдение условий хранения анализируемых образцов, которое может привести к разрушению анализируемого соединения или появлению в анализируемом образце веществ, искажающих результат анализа.

Неправильное дозирование растворов, которое приводит как к росту, так и к снижению регистрируемой флуоресценции.

Изменение концентрации раствора за счет испарения жидкости из открытого флакона с компонентом.

Использование оборудования, не прошедшего регламентированного периодического технического обслуживания и/или эксплуатирующегося не в соответствии с инструкцией по применению на данное оборудование.

Высыхание осадка магнитных частиц в пробирках между операциями.

Использование для работы с компонентами, анализируемыми и контрольными образцами грязных наконечников.

Внесение анализируемых образцов одним шпателем или наконечником.

Использование для дезинфекции посуды, оборудования, материалов и рабочих поверхностей неразрешенных и/или оказывающих влияния на результат ПЦРРВ дезсредств. Рекомендуется использовать, например, хлорамин и другие хлорсодержащие средства.

Рекомендуется использовать перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные и нарукавники одноразовые.

ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа все компоненты набора реагентов, **кроме «ГРС»**, необходимо выдержать не менее 20 мин при температуре от 17 до 27 °С.

Перед использованием содержимое флаконов (пробирок) с жидкими компонентами, входящими в состав набора реагентов, перемешать.

Подготовка «ГРС»

«ГРС» готова к использованию. Пробирки/стриппированные пробирки с «ГРС» использовать для постановки ПЦРРВ однократно.

ВНИМАНИЕ! Пакет с «ГРС» необходимо достать из холодильника непосредственно перед внесением образцов выделенной ДНК.

Вскрыть пакет с «ГРС», вынуть из пакета необходимое для проведения анализа число пробирок/стриппированных пробирок с «ГРС». Оставшиеся пробирки/стриппированные пробирки упаковать в пакет с вложенным в него влагопоглотителем, плотно закрыть пакет и поместить его в холодильник. Не удалять влагопоглотитель из пакета с «ГРС».

Хранение: неиспользованные пробирки/стриппированные пробирки в плотно закрытом пакете с вложенным в него влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С в течение одного месяца.

Подготовка «ЛБ-1», «ЛБ-2», «ОБ», «ПР-1», «ПР-2», «ЭР», «ОКО», «ВКО» и «ПКО»

Перед использованием содержимое каждого флакона (пробирки) тщательно перемешать. «ЛБ-1», «ЛБ-2», «ОБ», «ПР-1», «ПР-2», «ЭР» готовы к использованию.

Перед использованием флаконы с «ОКО», «ВКО» и «ПКО» центрифугировать в течение 1 мин при частоте вращения 13 000 об/мин.

В случае выпадения осадка во флаконе с «ЛБ-1» прогреть раствор до растворения осадка (при температуре не выше 65 °С), а затем тщательно перемешать.

Хранение: неиспользованные вскрытые «ЛБ-1», «ЛБ-2», «ОБ», «ПР-1», «ПР-2», «ЭР», «ОКО», «ВКО» и «ПКО» в плотно закрытых флаконах (пробирках) в течение срока годности набора реагентов при температуре от 2 до 8 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка анализируемых образцов для анализа (выделение ДНК из образцов)

Непосредственно перед проведением анализа необходимо провести выделение ДНК из анализируемых образцов по приведенной ниже схеме:

из образцов кала	из образцов желчи
Во все пробирки: - от 150 до 200 мг анализируемого образца - по 25 мкл «ВКО» - по 1000 мкл «ЛБ-1»	Во все пробирки: - 500 мкл анализируемого образца - по 25 мкл «ВКО» - по 500 мкл «ЛБ-1»
Перемешать на встряхивателе до гомогенной консистенции	Перемешать на встряхивателе в течение 15 сек
ВНИМАНИЕ! При внесении «ЛБ-1» нельзя касаться наконечником дозатора анализируемых образцов во избежание случайного переноса анализируемых образцов из одной пробирки в другую через наконечники	

Подготовка контрольных образцов для анализа

Непосредственно перед проведением анализа необходимо подготовить контрольные образцы по приведенной ниже схеме:

одна пробирка - 25 мкл «ПКО» и 25 мкл «ВКО»

одна пробирка - 25 мкл «ОКО»

во все пробирки – по 1000 мкл «ЛБ-1»

ВНИМАНИЕ! При внесении «ЛБ-1» нельзя касаться наконечником дозатора раствора во избежание случайного переноса раствора из одной пробирки в другую через наконечники

Проведение анализа

Инкубация	Пробирки с анализируемыми и контрольными образцами (далее – пробирки) закрыть крышками и инкубировать в термошейкере с частотой вращения платформы 1200 об/мин при температуре 65 °С в течение 10 мин
Центрифугирование	В течение 5 мин при частоте вращения 13 000 об/мин при комнатной температуре
Отбор раствора	Из каждой пробирки из средней части надосадочной жидкости отобрать одноразовым наконечником по 300 мкл раствора, не захватывая частиц осадка и/или верхнего жирового слоя, и перенести в новые пробирки
Центрифугирование	В течение 5 мин при частоте вращения 13 000 об/мин при комнатной температуре
Отбор раствора	Из каждой пробирки из средней части надосадочной жидкости отобрать по 100 мкл раствора, не захватывая частиц осадка и/или верхнего жирового слоя, и перенести в новые пробирки
Внесение реагентов	Во все пробирки внести по 650 мкл «ЛБ-2» и по 350 мкл «ОБ». Закрыть пробирки крышками и перемешать содержимое переворачиванием пробирки 5 - 7 раз
ВНИМАНИЕ! Перед применением необходимо тщательно перемешать «ЛБ-2» переворачиванием флакона пять раз или с помощью встряхивателя в течение 15 сек	
Инкубация	15 мин в ПЦР-боксе
Центрифугирование	В течение 30 сек при частоте вращения 3 000 об/мин при комнатной температуре
Промывка	Установить пробирки в магнитный штатив. Удалить надосадочную жидкость одноразовым наконечником с аэрозольным барьером. Внести в каждую пробирку по 500 мкл «ПР-1». Тщательно перемешать содержимое каждой пробирки на встряхивателе до гомогенизации осадка
ВНИМАНИЕ! При внесении «ПР-1» нельзя касаться наконечником дозатора поверхности пробирок во избежание кросс-контаминации через наконечники	
Центрифугирование	В течение 30 сек при частоте вращения 3000 об/мин при комнатной температуре
Промывка	Установить пробирки в магнитный штатив. Удалить надосадочную жидкость одноразовым наконечником с аэрозольным барьером. Внести в каждую пробирку по 150 мкл «ПР-2». Тщательно перемешать содержимое каждой пробирки на встряхивателе до гомогенизации осадка
ВНИМАНИЕ! При внесении «ПР-2» нельзя касаться наконечником дозатора поверхности пробирок во избежание кросс-контаминации через наконечники	
Центрифугирование	В течение 30 сек при частоте вращения 3 000 об/мин при комнатной температуре
Элюция	Установить пробирки в магнитный штатив. Удалить надосадочную жидкость одноразовым наконечником с аэрозольным барьером. Внести в каждую пробирку по 75 мкл «ЭР». Тщательно перемешать содержимое каждой пробирки на встряхивателе до гомогенизации осадка
ВНИМАНИЕ! Удалять надосадочную жидкость необходимо максимально полно	
Инкубация	Пробирки закрыть крышками и инкубировать в термошейкере при температуре 65 °С в течение 10 мин с частотой вращения платформы 1 200 об/мин
Центрифугирование	В течение 2 мин при частоте вращения 13 000 об/мин при комнатной температуре
ВНИМАНИЕ! Пакет с «ГРС» необходимо достать из холодильника непосредственно перед внесением образцов	

ДНК	В пробирки с «ГРС» внести по 25 мкл выделенной ДНК. Пипетировать раствор пять раз
ИНСТРУКЦИЯ	Во время пипетирования не захватывать магнитные частицы наконечником дозатора
Условия анализа	Выполнить в соответствии с разделом «Процедура измерения и оценки результата»

Процедура измерения и оценка результата

Ввести в амплификатор программу проведения ПЦРРВ:

1 стадия	95 °С, 3 мин
2 стадия	5 циклов (95 °С, 10 сек; 60 °С, 20 сек) не проводить измерение флуоресценции
3 стадия	40 циклов (95 °С, 10 сек; 60 °С, 20 сек) измерение флуоресценции на каналах FAM и ROX проводить при температуре 60 °С

Для детектирования следует выбирать два канала детекции **ROX** и **FAM**:

- для детектирования сигнала при амплификации ДНК описторхид в системе используется гибридационный ДНК-зонд, меченный флюорофором **ROX**;
- для детектирования сигнала при амплификации «ВКО» в системе используется гибридационный ДНК-зонд, меченный флюорофором **FAM**.

Запрограммировать положение пробирок с контрольными и анализируемыми образцами согласно инструкции к прибору.

Поместить пробирки в амплификатор.

Запустить программу и провести ПЦРРВ с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

РАСЧЕТЫ

1 Условия правильности работы набора реагентов

В «ПКО» прибор должен определять:

- нарастание сигнала флуоресценции в канале **ROX** и значение порогового цикла **Ct** в канале **ROX**;
- нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и значение порогового цикла **Ct** в канале **FAM**.

В «ОКО» прибор не должен:

- фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **ROX** и определять **Ct** в канале **ROX**;
- фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять **Ct** в канале **FAM**.

В каждом анализируемом образце прибор должен:

- фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять **Ct** в канале **FAM**.

2 Учет результатов анализа

Для «ОКО»: значение **Ct** в каналах **FAM** и **ROX** должно быть более 35 циклов или не определяться; если для «ОКО» значение **Ct** в каналах **FAM** и/или **ROX** меньше 35 циклов, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае результаты по данной постановке ПЦРРВ считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

Для «ПКО»: значение **Ct** в каналах **FAM** и **ROX** должно быть менее 35 циклов.

Для анализируемых образцов: значение **Ct** в канале **FAM** должно быть менее 35 циклов; если значение **Ct** в канале **FAM** для анализируемого образца более 35 циклов или не определяется, то для данного анализируемого образца следует повторить анализ, начиная с выделения ДНК.

3 Интерпретация результатов анализа

Если в анализируемом образце значение **Ct** в канале **ROX** не определяется или составляет более 35 циклов, анализируемый образец считать **отрицательным** на присутствие ДНК *O. felinus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, *M. bilis*.

выделенной ДНК	
Внесение ДНК	В пробирки с «ГРС» внести по 25 мкл выделенной ДНК. Пипетировать раствор пять раз
ВНИМАНИЕ! Во время пипетирования не захватывать магнитные частицы наконечником дозатора	
Инструкция	Выполнить в соответствии с разделом «Процедура измерения и оценки результата»
Результаты анализа	

Процедура измерения и оценка результата

Ввести в амплификатор программу проведения ПЦРРВ:

1 стадия	95 °С, 3 мин
2 стадия	5 циклов (95 °С, 10 сек; 60 °С, 20 сек) не проводить измерение флуоресценции
3 стадия	40 циклов (95 °С, 10 сек; 60 °С, 20 сек) измерение флуоресценции на каналах FAM и ROX проводить при температуре 60 °С

Для детектирования следует выбрать два канала детекции **ROX** и **FAM**:

- для детектирования сигнала при амплификации ДНК описторхид в системе используется гибридизационный ДНК-зонд, меченный флюорофором **ROX**;

- для детектирования сигнала при амплификации «ВКО» в системе используется гибридизационный ДНК-зонд, меченный флюорофором **FAM**.

Запрограммировать положение пробирок с контрольными и анализируемыми образцами согласно инструкции к прибору.

Поместить пробирки в амплификатор.

Запустить программу и провести ПЦРРВ с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

РАСЧЕТЫ

1 Условия правильности работы набора реагентов

В «ПКО» прибор должен определять:

- нарастание сигнала флуоресценции в канале **ROX** и значение порогового цикла C_t в канале **ROX**;

- нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и значение порогового цикла C_t в канале **FAM**.

В «ОКО» прибор не должен:

- фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **ROX** и определять C_t в канале **ROX**;

- фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять C_t в канале **FAM**.

В каждом анализируемом образце прибор должен:

- фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять C_t в канале **FAM**.

2 Учет результатов анализа

Для «ОКО»: значение C_t в каналах **FAM** и **ROX** должно быть более 35 циклов или не определяться; если для «ОКО» значение C_t в каналах **FAM** и/или **ROX** меньше 35 циклов, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае результаты по данной постановке ПЦРРВ считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

Для «ПКО»: значение C_t в каналах **FAM** и **ROX** должно быть менее 35 циклов.

Для анализируемых образцов: значение C_t в канале **FAM** должно быть менее 35 циклов; если значение C_t в канале **FAM** для анализируемого образца более 35 циклов или не определяется, то для данного анализируемого образца следует повторить анализ, начиная с выделения ДНК.

3 Интерпретация результатов анализа

Если в анализируемом образце значение C_t в канале **ROX** не определяется или составляет более 35 циклов, анализируемый образец считать **отрицательным** на присутствие ДНК *O. felinus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, *M. bilis*.

Если в анализируемом образце значение Ct в канале **ROX** составляет менее 35 циклов, анализируемый образец считать **положительным** на присутствие ДНК *Opisthorchis felinus* и/или *Opisthorchis viverrini* и/или *Clonorchis sinensis* и/или *Metorchis bilis*.

Данный набор реагентов нельзя использовать для постановки диагноза описторхоз.

4 Ограничения теста

В период от момента заражения до достижения описторхидами половозрелого возраста результат ПЦРРВ может быть ложноотрицательным, поэтому при подозрении на заражение описторхидами рекомендуется в дальнейшем провести тест повторно.

Проведенный анализ может быть ложноотрицательным у пациентов, страдающих холестазом, в связи с уменьшением или прекращением поступления желчи в просвет двенадцатиперстной кишки вследствие нарушения её синтеза, экскреции или выведения.

УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В процессе использования и утилизации наборов реагентов с истекшим сроком годности токсичные отходы не образуются.

Отходы, образующиеся в процессе использования набора реагентов относить к классу Б.

Наборы реагентов с истекшим сроком годности утилизировать как отходы класса Б.

Обращение (сбор, временное хранение, обеззараживание и/или обезвреживание и транспортирование) отходов, образующихся в процессе использования и утилизации наборов реагентов с истекшим сроком годности, проводить согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Для обеззараживания и/или обезвреживания отходов в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» использовать зарегистрированные в РФ дезсредства и оборудование в соответствии с инструкциями по их применению.

Отходы утилизировать через организации, имеющие лицензию на этот вид деятельности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Срок годности набора реагентов «Инвитролоджик Описторхи ДНК-скрин» 18 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор реагентов хранить в соответствии с СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов» при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности.

Транспортирование наборов реагентов производить в соответствии с СП 3.3.2.3332-16 при температуре от 2 до 8 °С.

Замораживание наборов реагентов не допускается.

Сроки годности вскрытых компонентов описаны в разделе «Подготовка компонентов набора реагентов» настоящей инструкции по применению.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых наборов реагентов требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки набора реагентов, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил применения, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, обращаться на предприятие-изготовитель ООО «Медико-биологический Союз» по адресу:

630090, г. Новосибирск, ул. Инженерная, д.16, оф. 353;

головной офис, тел./факс: 8-(383)-363-77-18;

отдел продаж, тел./факс: 8-(383)-363-77-09, многоканальный телефон: 8-(383)-363-77-01;

ОБТК, тел./факс: 8-(383)-363-77-23, e-mail: obtk@mbu.ru

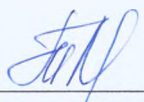
Символы, применяемые для маркировки набора реагентов

Символ	Наименование символа	Символ	Наименование символа
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014			
	Использовать до		Не использовать повторно
	Дата изготовления		Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу		Изделие медицинское для диагностики in vitro
	Не допускать воздействия солнечного света		Не использовать при поврежденной упаковке
	Беречь от влаги		Содержимого достаточно для 48 тестов
	Температурный диапазон		
ГОСТ 31340-2013			
	«Восклицательный знак» Сигнальное слово: «Осторожно» Место нанесения: «ЛБ-1», «ЛБ-2», «ВКО», «ОКО», «ПКО» и упаковка набора реагентов H302: Вредно при проглатывании H315: При попадании на кожу вызывает раздражение H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение		
 	- «Пламя» и - «Восклицательный знак» Сигнальное слово: «Опасно» Место нанесения: «ОБ», «ПР-1» и упаковка набора реагентов H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение H336: Может вызывать сонливость и головокружение		

Дата создания 03.04.2018

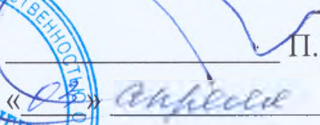
РАЗРАБОТАНО

Заместитель директора по производству
ООО «Медико-биологический Союз»


Т.Д. Ломовская
« 03 » апреля 2018 г.

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус
« 03 » апреля 2018 г.



Прошито пронумеровано скреплено
печатью на (9) листах
Директор ООО «Медико-биологический
Союз» _____ М.В. Лосев

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 9 ЛИСТОВ

03 » 04 201__ год



Ген. Директор
ООО «ВММПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Е.К. _____