



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для выявления ДНК *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» по ТУ 21.20.23-002-83881765-2020

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для выявления ДНК *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» предназначен для выявления ДНК протиста *Giardia lamblia*, выделенной из биологических образцов человека (фекалии, мазки из прямой кишки), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

1.2. *Giardia lamblia* (синонимы: *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*) — вид паразитических жгутиковых простейших, паразитирующих в тонкой кишке человека и других млекопитающих и птиц, возбудитель лямблиоза. Лямблиоз — это протозойная инвазия, характеризующаяся нарушением функции тонкой кишки или бессимптомным носительством возбудителя.

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 клинико-диагностических лабораторий.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В основе диагностического действия «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» лежит метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома *Giardia lamblia* и ДНК внутреннего контрольного образца (геномная ДНК человека) в мультиплексной полимеразной цепной реакции.

Процедура анализа состоит из трёх этапов: 1) выделение ДНК, 2) проведение ПЦР с детекцией в реальном времени, 3) анализ результатов. Для детекции и анализа результатов используются два канала, имеющиеся практически во всех амплификаторах для ПЦР в реальном времени:

- 1) Канал R6G (аналоги - Joe/Vic/Tet/Hex/Yellow): макс. поглощения 530 нм, макс. флуоресценции 570 нм; детекция ДНК *Giardia lamblia*
- 2) Канал FAM (аналог - Sybr Green/Green): макс. поглощения 495 нм, макс. флуоресценции 520 нм; детекция внутреннего контроля (геномная ДНК человека).

Показанием к применению Набора реагентов «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» является комплексная диагностика лямблиоза всех групп населения.

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 реагентов входят :

- Микс ПЦР-лямблии;
- Положительный контрольный образец (ПКО);
- Отрицательный контрольный образец (ОКО);
- S-Taq-полимераза.

Набор выпускается в 2 вариантах исполнения:

Комплект №1 (кат. № Общ-3-50)

Набор реагентов для выявления ДНК *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» на 50 определений, в составе:

- Микс ПЦР-лямблии – 1 пробирка 750 мкл;
- Положительный контрольный образец – 1 пробирка 180 мкл;
- Отрицательный контрольный образец – 1 пробирка 180 мкл;
- S-Taq-полимераза – 1 пробирка 27 мкл.

Комплект №2 (кат. № Общ-3-100)

Набор реагентов для выявления ДНК *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» на 100 определений, в составе:

- Микс ПЦР-лямблии – 1 пробирка 1500 мкл;
- Положительный контрольный образец – 1 пробирка 360 мкл;
- Отрицательный контрольный образец – 1 пробирка 360 мкл;
- S-Taq-полимераза – 1 пробирка 55 мкл.

В состав Микс ПЦР-лямблии входят:

- раствор дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфаты);
- трис солянокислый;
- ПЦР-буфер;
- специфичные праймеры;
- флуоресцентные зонды: зонды для специфического фрагмента флуорофор R6G и зонд для внутреннего контроля - флуорофор FAM;
- праймеры внутреннего контроля (на геномную ДНК); для контроля прохождения реакции ПЦР, контроля качества выделения ДНК и исключения ингибирования реакции, контроль взятия материала.

В состав Положительного контрольного образца входят:

- геномная ДНК животных рода *Mammalia*, геномная ДНК *Giardia lamblia*;
- трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид;

В состав Отрицательного контрольного образца входят:

- вода очищенная.

В состав S-Taq-полимеразы входит:

- термостабильная Taq ДНК-полимераза, инактивированная антителами для организации горячего старта

ВНИМАНИЕ! В набор не входят реактивы для выделения нуклеиновых кислот. Выделение ДНК может проводиться с помощью наборов, зарегистрированных в установленном порядке на территории Российской Федерации, предназначенных для выделения ДНК из клинического материала на основе сорбционного метода.

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 отрицательных биопроб стандартного образца предприятия, СОП ГЛ (СОП 02-1) 100%.

3.3. Не обнаружено перекрестной реактивности со следующими потенциальными интерферентами:

- гемоглобин (кровь);
- *Blastocystis hominis*;
- *Dientamoeba fragilis*;
- *Isospora belli*;
- *Cryptosporidium parvum*;
- *Entamoeba histolytica*;
- *Escherichia coli*.

3.4. В ходе клинических испытаний будет получена информация о диагностической чувствительности и диагностической специфичности.

3.5. В норме ДНК *Giardia lamblia* отсутствует.

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 клиничко-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 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 клинко-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;
- микроцентрифуга, на 13000 об./мин;
- набор одноканальных дозаторов с переменным объёмом;
- штативы для наконечников и микропробирок;
- одноразовые наконечники с фильтрами для дозаторов;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки;
- 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).

* использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку или аттестацию.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования можно использовать фекалии или мазки из прямой кишки. Фекалии собирают в стерильный пластиковый контейнер (5-20 гр). Для выделения ДНК из фекалий готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе (тщательно перемешать до образования гомогенной суспензии). Дают отстояться 3-5 мин, чтобы грубая фракция осела. Для выделения ДНК используется надосадочная жидкость.

Мазок отбирается стерильными зондами с ватными тампонами. После забора материала тампон помещается в стерильную одноразовую пробирку с физиологическим раствором (0,5 – 1 мл).

Биологический материал следует хранить не более 3 суток при температуре 2-8 °С, более длительное хранение при температуре не выше минус 16 °С.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

Реагенты достать из холодильника и выдержать при комнатной температуре 30 минут. Реагенты готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение нуклеиновых кислот

Подготовка образцов к выделению

Мазки

Если содержание материала в растворе высокое (раствор мутный, непрозрачный), то для выделения ДНК достаточно 100 мкл пробы. Если содержание материала низкое (раствор прозрачный), то следует весь объём пробы центрифугировать 5 минут при 10 000 об/мин. Затем осторожно удалить супернатант, оставив над осадком примерно 100 мкл жидкости. Осадок суспендировать в оставшейся жидкости и суспензию использовать для выделения ДНК.

Фекалии

Из фекалий приготовить 10%-ю суспензию на стерильном физ. растворе или дистиллированной воде. Для выделения ДНК использовать 100 мкл суспензии.

Внутренним контролем является геномная ДНК человека.

1-й этап – выделение ДНК из клинического материала

Перед проведением анализа с использованием Набора реагентов «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» необходимо выделить ДНК исследуемого возбудителя из клинического образца (фекалии, мазки из прямой кишки). Выделение ДНК из клинического образца (части образца) может осуществляться любым из зарегистрированных на территории Российской Федерации наборов, предназначенных для выделения ДНК *Giardia lamblia* из клинического материала, согласно инструкции к наборам.

Постановка ПЦР

Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР с учётом контрольных образцов.

1. В отдельной стерильной пробирке (1,5 мл) смешайте входящие в набор Микс ПЦР и S-Taq полимеразу, в указанных ниже пропорциях:

Компонент	На 1 реакцию (мкл)	1)	На N реакций (мкл)
Микс ПЦР	15	2)	15xN
S-Taq полимеразы	0,5	3)	0,5xN

Важно! При добавлении S-Тaq полимеразы обязательно погружайте наконечник в раствор и пипетируйте для полного смывания фермента с наконечника пипетки. Перемешайте подготовленную смесь на вортексе и осадите капли кратковременным центрифугированием (2-3 сек).

- 2. После приготовления смеси перенесите по 15 мкл в каждую микропробирку для ПЦР.
- 3. Внесите в первую микропробирку с ПЦР смесью 10 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО).
- 4. В следующие микропробирки добавьте по 10 мкл исследуемых проб.
- 5. В последнюю микропробирку добавьте 10 мкл положительного контрольного образца (ПКО).

Важно! Пробирку с положительным контрольным образцом, входящую в набор, открывайте только после раскапывания и закрытия крышек всех микропробирок с исследуемыми пробами для предотвращения контаминации.

- 6. Поместите микропробирки в амплификатор и запустите программу амплификации:

Температура	Время (сек)	Кол-во циклов
95°C	180	1
60°C*	30	40
95°C	10	

* - на данном этапе установить детекцию сигнала флюоресценции

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По каналу R6G регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК Giardia lamblia.

По каналу FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации внутреннего контроля.

По таблице 1 проверьте значения Ct контрольных образцов.

Таблица 1. Значения Ct для контрольных образцов.

	Канал FAM	Канал R6G
КО-	> 40*	> 40*
КО+	< 30	< 35

* - значение не вычисляется

При соответствии значений контрольных образцов, определите Ct исследуемых проб и определите результат по таблице 2.

Таблица 2. Определение результата исследуемой пробы по значениям Ct.

Канал FAM	Канал R6G	Результат
< 30	< 35	ДНК Giardia lamblia обнаружена
< 30	> 40*	ДНК Giardia lamblia не обнаружена
> 30	< 40	Необходимо повторить исследование материала с этапа выделения. **
30...40	> 40	Необходимо повторить исследование материала с этапа выделения. ***

* - значение не вычисляется

****** - данный результат находится на грани достоверности. Необходимо повторить исследование материала с этапа выделения. При воспроизведении результата – считать **ДНК Giardia lamblia обнаружена**. Если результат не воспроизводится, то расчет произвести согласно таблице 2.

******* - данный результат находится на грани достоверности. При воспроизведении результата необходим перезабор исследуемого материала. Если результат не воспроизводится, то расчет произвести согласно таблице 2.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей Инструкции.

10. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

Набор реагентов «ФБио – ДНК Giardia lamblia» предназначен для диагностических целей, однако окончательный диагноз не должен основываться только на результатах данного теста. Диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

11.1. Транспортирование.

11.1.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, уложенным в пенопластовые контейнеры с хладагентом, при температуре от плюс 2°C до плюс 8°C. Допускается транспортировка при температуре до плюс 15°C не более 7 суток.

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

11.2. Хранение.

11.2.1. Хранение должно осуществляться в упаковке предприятия при температуре от плюс 2°C до плюс 8°C в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня изготовления предприятием. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

Набор реагентов после вскрытия упаковки стабилен в течение всего срока годности при условии хранения при температуре от плюс 2°C до плюс 8°C.

11.2.2. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

11.3. Эксплуатация.

11.3.1. 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.

11.3.2. 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.

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

11.4. Утилизация.

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

11.4.2. При использовании набора образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 4.1.7.2790-10 «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».

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

12. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

12.3. 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.

12.4. 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 выявления ДНК *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени («ФБио – ДНК *Giardia lamblia*») 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
« 14 » 02 2020 г



Погода А.А.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ
«15» 06 2020 год

Ген.директор
ООО «Фрактал Био»
Погода А.А.



ПАСПОРТ

Набор реагентов для выявления ДНК *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» по проекту ТУ 21.20.23-002-83881765-2020

	Наименование показателей	Требования ТУ 21.20.23-002-83881765-2020	Результаты контроля лот № , дата производства . . , годен до . .	Отметка о соответствии
1. Внешний вид				
1.1	Микс ПЦР-лямблии	Прозрачная бесцветная или светло-розовая жидкость		
1.2	Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость		
1.3	Отрицательный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость		
1.4	S-Taq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость		
2. Технические характеристики				
2.1.	Правильность определения ДНК <i>Giardia lamblia</i>			
2.1	Чувствительность (выявление 100 копий ДНК <i>Giardia lamblia</i> по стандартному образцу предприятия), %	100		
2.2	Специфичность выявления ДНК <i>Giardia lamblia</i> (по стандартному образцу предприятия), %	100		
2.3	Отрицательный образец этапа амплификации	Отсутствие нарастания сигнала амплификации ДНК ВКО в канале «FAM/Green» и отсутствие нарастания сигнала амплификации ДНК <i>Giardia lamblia</i> в канале «HEX/Yellow»		
2.4	Положительный образец этапа амплификации	Нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО в канале «FAM/Green», значение порогового цикла Ct ВКО менее 30. Нарастание сигнала амплификации ДНК <i>Giardia lamblia</i> в канале «HEX/Yellow», значение порогового цикла Ct ПКО менее 35.		
	Герметичность	отсутствие следов жидкости на бумаге и на флаконе		

Контролер



Чистякова Е.А.
(старший технолог)

Штамп ОТК изготовителя



Заключение: набор соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-83881765-2020