

Федеральное бюджетное учреждение науки
**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. ПАСТЕРА**
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека
(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)
197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14.
Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 644-63-10
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; официальный веб-сайт: www.pasteurorg.ru
ОКПО 01967164, ОГРН 001037828006314; ИНН/КПП 7813047047/781301001

ИНСТРУКЦИЯ по применению Набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала (НУКЛЕО-преп PS)

ТУ 21.20.23-035-01967164-2020
ПУ № РЗН 2021/14830 от 20 июля 2021 г.

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения медицинского изделия (МИ) для *in vitro* диагностики Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала (НУКЛЕО-преп PS), разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

1. Назначение

1.1 Медицинское изделие НУКЛЕО-преп PS не имеет измерительной функции и предназначено для выделения нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) из клинического материала (мазков из носа и зева, плазмы периферической крови, ликвора, слюны) на преаналитической стадии для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью выявления возбудителей вирусных, бактериальных и грибковых инфекций человека (РНК- и ДНК-содержащие вирусы, грамположительные и грамотрицательные бактерии, грибы рода *Candida*).

1.2 Тип анализируемого образца

В качестве анализируемого образца используются мазки из носа и зева, плазма периферической крови, ликвор, слюна.

1.3 Потенциальные потребители

Потенциальными потребителями МИ являются специалисты учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (центры гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, противочумные учреждения, научные организации, санитарно-эпидемиологические службы министерств и ведомств), а также специалисты медицинских учреждений, имеющие специальность врача клинической лабораторной диагностики или биолога согласно требованиям Приказа Минздрава России от 23.07.2010 г. и Приказа Минздрава № 707 н от 8.10.2015 г.

К работе с МИ допускаются только специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.1318-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)», СП 1.3.2518-09 (1.3.2322-08) «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

1.4 Предназначение МИ для клинической лабораторной диагностики

Выделение НК возбудителей инфекционных заболеваний - важный шаг подготовки проб перед многими биохимическими и диагностическими лабораторными процессами. Многие диагностические приемы и методы, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, детекция накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительного выделения и очистки нуклеиновых кислот. Поэтому комплексная обработка биологических образцов перед дальнейшим исследованием, заключающаяся в получении препаратов высокоочищенных недеградированных молекул НК, является ключевым фактором, определяющим эффективность диагностического анализа с использованием различных молекулярно-диагностических методов, в том числе полимеразной цепной реакции.

2. Риски применения

Все компоненты МИ в используемых концентрациях являются нетоксичными, поэтому при использовании по целевому назначению МИ безопасно и не обладает токсичностью.

Риски возникновения опасных последствий применения МИ при его использовании определены согласно требованиям ГОСТ Р 51088-2013.

2.1 Потенциальный риск применения

По степени потенциального риска применения МИ относится к классу 2а (п. 9.3. Приказа МЗ РФ № 4н от 06.06.2012 г. Раздел II. Классификация медицинских изделий для диагностики *in vitro* и п. 5.2.3 ГОСТ Р 51088-2013.

2.2 Прямой риск применения

При использовании МИ требуется соблюдение мер биологической безопасности и асептической техники взятия биологических образцов. Следует исходить из предположения, что все собранные для анализа с помощью МИ образцы представляют собой потенциально инфекционный материал, обращаться с которым следует, соблюдая технику безопасности согласно ГОСТ Р 52905-2007.

2.3 Косвенный риск применения

Косвенный риск применения МИ связан с вероятностью получения ложноотрицательных результатов, что может привести к ошибочному медицинскому решению и отрицательно повлиять на тактику терапевтических и противоэпидемических мероприятий.

Причинами ложноотрицательных результатов могут быть:

- 1) порча отдельных компонентов МИ в результате несоблюдения условий его транспортировки и хранения до использования;
 - 2) превышение гарантийных сроков хранения, указанных на этикетках;
 - 3) несоблюдение требований инструкции по применению в ходе обработки образцов.
 - 4) использование при проведении работ лабораторной посуды и реагентов, содержащих активные рибонуклеазы.
- Поскольку любой тип клеток, присутствующих в биологическом материале, содержит оба типа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) ложноположительные результаты при использовании набора реагентов НУКЛЕО-преп PS идентифицировать невозможно.

3. Характеристика МИ

3.1 Принцип метода экстракции нуклеиновых кислот
Исследуемые пробы биологического материала (мазки из носа и зева, образцы плазмы периферической крови, ликвора, слюны) смешивают с лизирующим раствором (Раствор №1), в результате чего происходит деструкция клеточных мембран и вирусных оболочек, разрушение липидного слоя клеток, денатурация нуклеопротеиновых комплексов с последующим высвобождением нуклеиновых кислот. Добавление преципитирующего раствора (Раствор №2) приводит к осаждению нуклеиновых кислот. Последующая 2-кратная отмывка осадка растворами для отмывки (Раствор № 3 и Раствор № 4) способствует получению высокоочищенных концентрированных препаратов нуклеиновых кислот. На заключительном этапе осадок НК подсушивается и переводится в водную фазу с помощью раствора для растворения НК (Раствор № 5). В таком виде образец экстрагированных НК пригоден для исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

3.2 Эффективность выделения НК

Показатель эффективности выделения НК, рассчитанный, как отношение количества выделенных НК из клеток линии фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104 к теоретическому содержанию НК в них, составляет не менее 30%.

3.3 Степень чистоты НК, экстрагируемых из клеток линии ФЛЭЧ-104, оцениваемая по соотношению оптических плотностей финального препарата НК при 260 и 280 нм, составляет не менее 1,7.

3.4 Минимальное количество биологического материала, из которого может быть выделен препарат нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) при использовании МИ для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции соответствует 1000 геномных копий/мл.

3.5 Влияние интерферентов на степень чистоты выделенных НК
Установлено, что присутствие в исследуемом образце гемоглобина в концентрации 105 мг/мл и муцина в концентрации 0,9 мг/мл не оказывают влияния на степень чистоты выделенных НК.

3.6 Состав МИ

Набор реагентов НУКЛЕО-преп PS выпускается в одном варианте комплектации, рассчитанном на выделение НК из 100 образцов (табл. 1). Каждое изделие сопровождается копией паспорта качества, которая может быть изготовлена в бумажном виде или на электронном носителе, либо представлена на официальном сайте производителя (<https://pasteurorg.ru>).

Таблица 1 - Состав медицинского изделия

№ п/п	Наименование компонента МИ	Объем, мл	Количество
1.	Раствор № 1	30,0	1 фл.
2.	Раствор № 2	40,0	1 фл.
3.	Раствор № 3	50,0	1 фл.
4.	Раствор № 4	20,0	1 фл.
5.	Раствор № 5	1,2	5 проб.
Эксплуатационная документация			
6.	Инструкция к набору реагентов		1 шт.
7.	Паспорт качества		1 шт.

4. Меры предосторожности

Набор реагентов НУКЛЕО-преп PS выпускается в одном варианте комплектации, рассчитанном на выделение НК из 100 образцов (табл. 1).

4.1 В соответствии с п. 2.1.6. СП 1.3.3118-13 и согласно требованиям СП 1.3.2518-09 (1.3.2322-08) использование Набора реагентов НУКЛЕО-преп PS может производиться в лабораториях, выполняющих ПЦР-исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней (без накопления патогена) и имеющих разрешительную документацию на работу с возбудителями III-IV групп патогенности, специально обученным персоналом. В случае использования Набора реагентов НУКЛЕО-преп PS для выполнения лабораторных исследований по обнаружению возбудителя COVID-19, отнесенного ко II группе патогенности, все образцы, полученные для диагностических исследований, следует считать потенциально инфекционными, и при работе с ними до этапа лизиса клеток должны соблюдаться требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Помещения и оборудование лаборатории при проведении этиологической диагностики COVID-19 методом ПЦР должны соответствовать вышеприведенным санитарным правилам, а также правилам, изложенным в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.2 При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- температура в помещении лаборатории должна быть от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%;
- уничтожать образцы в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)»;
- 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;
- все использованные одноразовые материалы и другие отходы должны подвергаться обработке дезинфицирующими средствами и последующей утилизации в соответствии с требованиями СанПин 2.1.7.2527-09 (2.1.7.728-99) «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».
- поверхности столов, а также помещения, в которых проводится выделение НК, постановка ПЦР, до начала и после завершения работ в соответствии с требованиями Руководства Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях» необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 минут с применением бактерицидных УФ-излучателей. По окончании работы согласно СП 1.3.2518-09 (1.3.2322-08) поверхность лабораторных столов, на которых проходило выделение НК из клинических образцов, должны подвергаться обработке регламентированными дезинфицирующими средствами.
- Набор реагентов готов к применению. Применять МИ строго по назначению;
- к работе с Набором реагентов допускаются только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы с микроорганизмами III группы патогенности в установленном порядке (Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2518-09 (1.3.2322-08) «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»);
- не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию;
- не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- не использовать Набор реагентов 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 проводить только в перчатках для исключения контакта с организмом человека;
- избегать вдыхания паров, контакта реагентов МИ с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью;
- при соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют;
- информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

4.3 Особые указания

Допускается хранение неиспользованных компонентов Набора реагентов для дальнейшего использования, которое осуществляется при температурах, указанных в п. 8, в зоне экстракции НК.

4.4 Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности МИ безопасно.

5. Требуемое дополнительное оборудование и материалы

- 1) Ламинарный бокс биологической безопасности II класса (например, БАВп-01-«Ламинар-С-1.2» - Ламинарные системы, Россия, или аналогичный);
- 2) Микроцентрифуга для пробирок «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12000 g (например, MiniSpin, Eppendorf, Германия, или аналогичная).
- 3) Вортекс (например, SIA Biosoap, Латвия, или аналогичный).
- 4) Термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100 °С (например, SIA Biosoap, Латвия, или аналогичный).
- 5) Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
- 6) Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от минус 18 до минус 25 °С.
- 7) Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема из трех дозаторов объемом 1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл (например, дозаторы «ЛАИТ» Ленпипет, Россия, или аналогичные)
- 8) Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, Axigen, США, или аналогичные)
- 9) Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток переменного объема: до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл, свободные от РНКаз и ДНКаз, стерильные (например, Axigen, США, или аналогичные)
- 10) Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, ИнтерЛабСервис, Россия, или аналогичные);
- 11) Емкость для сброса отработанных расходных материалов;
- 12) Комплект спецодежды – халат, шапочка, обувь, предназначенные для работы в каждой зоне отдельно;
- 13) Резиновые (латексные, нитриловые, виниловые) неопудренные перчатки одноразового применения;
- 14) Раствор для деконтаминации (в случае контаминации) (0,2%-ный раствор ДП-2Т, хлорацета или аналогичный).

6. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

Все работы с клиническим материалом, включая забор, транспортирование и подготовку материала для исследований, проводятся в соответствии с действующими нормативными и методическими документами, регламентирующими деятельность с возбудителями III-IV групп патогенности, согласно санитарным правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)» и согласно требованиям МУ 1.3. 2569-09 и СП 1.2.036-95.

В случае подозрения на инфицированность диагностического материала SARS-CoV-2 его забор, упаковка, маркировка и транспортировка осуществляется в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранении и транспортировке согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и Методическими рекомендациями Роспотребнадзора МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», Временными методическими рекомендациями ДЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в последней версии (в настоящее время версия 9 от 26.10.2020 г.).

7. Проведение анализа

7.1 Меры предосторожности

Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Все работы проводятся при 20-28 °С и относительной влажности воздуха 15-75%.

Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

При работе с МИ необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть руки по окончании работы.

Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

При выполнении выделения ДНК/РНК необходимо использовать только пробирки и одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов, сертифицированные производителем на отсутствие ДНКаз, РНКаз.

Не допускается повторное использование наконечников.

Все использованные одноразовые материалы должны подвергаться обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

7.2 Требования к персоналу

Набор реагентов НУКЛЕО-преп PS предназначен для профессионального применения и должен использоваться специалистами, имеющими достаточную квалификацию.

7.3 Процедура выделения НК из клинического материала

Выделение НК с помощью МИ НУКЛЕО-преп PS проводят в специальной зоне для работы с образцами.

Для выделения НК из образцов клинического материала необходимо провести следующие стадии.

7.3.1 Подготовить и промаркировать необходимое количество сертифицированных производителем на отсутствие ДНКаз, РНКаз микропробирок объемом 1,5 мл в соответствии с количеством исследуемых проб и две дополнительные микропробирки для ОКО и ПКО, если они предусмотрены для анализа данного возбудителя инфекции.

7.3.2 Внести в каждую подготовленную микропробирку ВКО, если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции в объеме, рекомендованном производителем ПЦР-набора.

7.3.3 Добавить в каждую микропробирку по 300 мкл Раствора № 1. Если раствор хранился при температуре 2-8 °С и в нем образовался кристаллический осадок, то его необходимо предварительно прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка.

7.3.4 Пробирки с образцами предварительно встряхнуть или выдержать на вортексе в течение 1 мин.

7.3.5 В пробирки для образцов внести по 100 мкл подготовленных проб, используя сертифицированные производителем на отсутствие ДНКаз, РНКаз наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля внести 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО (если используются).

7.3.6 Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, отцентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.

7.3.7 В каждую микропробирку внести по 400 мкл Раствора № 2, плотно закрыть крышки и перемешать на вортексе.

7.3.8 Отцентрифугировать микропробирки на микроцентрифуге при 13000 об./мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

7.3.9 Из каждой микропробирки аккуратно отобрать, не задевая осадок, надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

7.3.10 В каждую микропробирку внести по 500 мкл Раствора № 3. Пробирку закрыть крышкой и перемешать на вортексе.

7.3.11 Центрифугировать микропробирки при 13000 об./мин в течение 1-2 мин при комнатной температуре.

7.3.12 Из каждой микропробирки осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельные наконечники для каждой пробы.

7.3.13 Добавить в каждую микропробирку по 200 мкл Раствора № 4 и центрифугировать при 13000 об./мин в течение 2 мин при комнатной температуре.

7.3.14 Из каждой микропробирки осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельные наконечники для каждой пробы.

7.3.15 Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

7.3.16 Добавить в каждую микропробирку по 50 мкл Раствора № 5, предварительно прогретого до 65 °С, и перемешать содержимое пробирок на вортексе.

7.3.17 Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин.

7.3.18 Отцентрифугировать пробирки при 13000 об./мин в течение 1 мин на микроцентрифуге.

7.3.19 Надосадочная жидкость содержит очищенный препарат НК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ-ПЦР или ПЦР.

7.3.20 Препараты очищенных НК могут храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

7.4 Предупреждения

При работе с НК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, сертифицированные производителем на отсутствие ДНКаз, РНКаз и имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

8. Условия транспортирования и хранения МИ

ДНКаз, РНКаз и имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Срок годности – 12 месяцев со дня утверждения ОБТК производства, при соблюдении условий транспортирования и хранения.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, с нарушением целостности упаковки предприятия-изготовителя, использованию не подлежит.

Транспортирование набора реагентов может производиться любым видом крытого транспорта при температуре от 2 до 25 °С.

Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Условия отпуска - Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

9. Указания по утилизации

При проведении исследований образуются отходы, относящиеся к классам А, Б, В, Г (СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»).

Отходы, образующиеся в ходе применения МИ, утилизируются в соответствии с типом отходов. При этом упаковка набора, компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.

Учитывая потенциальную инфекционную опасность исследуемых образцов и их отходов, следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом, - остатки исследуемых образцов, не используемые для дальнейших исследований или биобанкирования, относятся к классу Б.

Утилизация, уничтожение, дезинфекция отходов проводятся в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)»; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала (НУКЛЕО-преп PS), следует обращаться к предприятию-изготовителю ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по адресу: 197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14 Телефон (812) 233-20-92, (812) 644-63-17, факс (812) 644-63-10 E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; Официальный веб-сайт: www.pasteurorg.ru

