

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2010 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению набора реагентов для выделения ДНК из клинических образцов

«РеалБест ДНК-экстракция 3»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК-экстракция 3» (далее по тексту – набор) предназначен для выделения ДНК на магнитном штативе (без использования центрифуги) из мочи, сыворотки (плазмы) крови, а также соскобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища и др.

Набор реагентов «РеалБест ДНК-экстракция 3» может быть применен в клинической практике при диагностике инфекционных заболеваний человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Набор рассчитан на выделение ДНК из 96 образцов, включая контрольные образцы. Обеспечивает возможность проведения до 6 независимых процедур выделения по 16 образцов в каждой, включая контроли.

Набор может быть использован для автоматического выделения с помощью соответствующего оборудования (например, KingFisher Flex, фирма Thermo Fisher Scientific, Финляндия)

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип действия набора «РеалБест ДНК-экстракция 3» состоит в температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, который разрушает комплексы нуклеиновых кислот с белками, с последующей сорбцией на магнитные частицы, покрытые силикагелем, спиртовой отмывкой и элюцией. Положительный контрольный образец (ПКО) входит в состав ПЦР-наборов серии «РеалБест». ПКО проходит процедуру выделения наравне с биологическими пробами и отрицательным контрольным образцом.

2.2. Состав набора:

- | | |
|---|--------------------------|
| – лизирующий раствор, готовый к применению | – 6 флаконов (по 10 мл); |
| – раствор для отмывки, готовый к применению | – 6 флаконов (по 20 мл); |
| – элюирующий раствор, готовый к применению | – 6 флаконов (по 12 мл); |
| – сорбент (суспензия магнитных частиц) | – 2 флакона (по 1 мл); |
| – внутренний контрольный образец (ВКО) | – 1 флакон (2 мл); |
| – отрицательный контрольный образец (ОКО) | – 2 флакона (по 1 мл). |

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Тест на отсутствие ингибирования и эффективность выделения (по ДНК *Chlamydia trachomatis*) – 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными

правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный бокс 2 класса биологической защиты типа БАВп-01-«Ламинар-с»
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру 2-8°C;
- шейкер-инкубатор воздушный (например, ES-20, Biosan, Латвия);
- отсасыватель медицинский (например, В-40 (ВИСМА-ПЛАНАР));
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);
- одноразовые наконечники для пипеток (например, фирмы FinnTip, Финляндия);
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл (например, фирмы SSI, кат. № 2340, США);
- магнитный штатив для микропробирок (ЗАО «Вектор-Бест», кат. № Е-9291);
- контейнер с дезинфицирующим раствором («Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-Проект, Россия).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Подготовка сыворотки и плазмы крови

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать плазму или сыворотку в отдельную пробирку.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °С до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °С не более суток; при температуре минус 20 °С до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Образцы сывороток или плазмы крови перед использованием необходимо отцентрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

Внимание. Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы

6.2. Подготовка соскобов эпителиальных клеток

Исследуемый материал (соскоб эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища и др.), забранный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в пробирку с транспортным раствором (производства ЗАО «Вектор-Бест»). Тщательно перемешать, остатки жидкости на зонде отжать о стенку пробирки, зонд извлечь (выбросить в контейнер с дезинфицирующим раствором), пробирку плотно закрыть.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °С до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °С не более суток; при температуре минус 20 °С до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.3. Подготовка мочи

Первую порцию утренней мочи собрать в чистый флакон с плотной крышкой. 1,5-2,0 мл мочи отобрать в пробирку, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удалить практически полностью, не задевая осадок. Полученный образец использовать для выделения нуклеиновых кислот.

Допускается хранение подготовленных образцов из мочи в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С в течение 1 недели.

6.4. Подготовка компонентов набора

6.4.1. Перед началом работы необходимо достать набор из холодильника и выдержать при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут.

6.4.2. Достать из набора для ПЦР серии «РеалБест» флакон с положительным контрольным образцом (ПКО).

6.4.3. Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к применению. После вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

6.4.4. Перед началом работы прогреть лизирующий раствор при 50-60 °С до растворения осадка, перемешать.

6.4.5. Добавить во флакон с лизирующим раствором 200 мкл ВКО.

6.4.6. Перемешать на вортексе содержимое пробирки с сорбентом до состояния гомогенной дисперсии и во флакон с лизирующим раствором (с ВКО) добавить 200 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

7. ОБРАБОТКА КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБ (ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК)

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая положительный и отрицательный контроли). Установить их в пластиковый вкладыш от магнитного штатива.

7.2. В пробирку отрицательного контроля выделения внести 100 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО).

7.3. В пробирку положительного контроля выделения внести 80 мкл ОКО и 20 мкл положительного контрольного образца (ПКО) (является компонентом набора на ПЦР).

7.4. В пробирки (кроме пробирок с осадком мочи) аккуратно, не допуская разбрызгивания, внести по 100-200 мкл проб*, используя наконечники с аэрозольным барьером.

**Перед внесением пробы аккуратным пипетированием ресуспендировать осадок из клеток, чтобы в выделение попала суспензия клеток.*

Внимание! Перед добавлением лизирующего раствора вкладыш с пробирками не должен находиться на магнитном штативе!

7.5. Перемешать флакон с лизирующим раствором (с ВКО и сорбентом) до состояния суспензии. В каждую пробирку внести по 500 мкл лизирующего раствора с ВКО и сорбентом.

Внимание! При использовании воздушных термостатов на протяжении всего выделения пробирки не нужно закрывать/открывать, а также вынимать из пластикового вкладыша.

7.6. Поместить вкладыш с пробирками в предварительно прогретый до 42°C шейкер-инкубатор и прогреть в течение 5 минут с шейкированием 250 об/мин.

7.7. Вкладыш с пробирками оставить при температуре от 18 до 25°C на 10 мин.

7.8. Установить вкладыш с пробирками на магнитный штатив, выдержать 1 мин.

7.9. Используя отдельный наконечник для каждого образца, отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.10. Снять вкладыш с пробирками с магнитного штатива.

7.11. В каждую пробирку к осадку добавить 1000 мкл раствора для отмывки. Выдержать 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

7.12. Установить вкладыш с пробирками на магнитный штатив, выдержать 1 мин.

7.13. Используя отдельный наконечник для каждого образца, максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.14. Снять вкладыш с пробирками с магнитного штатива.

7.15. В каждую пробирку к осадку добавить по 600 мкл элюирующего раствора. При добавлении раствора осадок частиц должен разбиться, если этого не произошло, ресуспендировать осадок пипетированием, используя отдельный наконечник для каждого образца.

7.16. Поместить вкладыш с пробирками в предварительно прогретый до 42°C шейкер-инкубатор и прогреть в течение 10 минут с шейкированием 250 об/мин.

7.17. Установить вкладыш с пробирками на магнитный штатив на 1 мин.

Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

Внимание: выделенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °C в течение суток.

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 8 °C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °C не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

8.2. Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

8.3. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

8.4. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

9. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.

Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе

ГУЗМ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

профессор, д.м.н.



М.М. Абакумов



Принципиально
информировано
экстренно печатно
4 (силь) мисов

[Handwritten signature]