

УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 ____ г. № _____



Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«21» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выделения ДНК из клинических образцов

«Лизирующий раствор»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Лизирующий раствор» предназначен для выделения ДНК из скобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища, ротоглотки, конъюнктивы глаза и др., а также спермы, слюны и мочи человека.

1.2. Набор может быть применён в клинической практике при диагностике различных инфекционных заболеваний человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.3. Набор рассчитан на выделение ДНК из 200 образцов, включая контрольные образцы.

1.4. Набор реагентов «Лизирующий раствор» предназначен для применения с наборами для выявления ДНК возбудителей инфекционных заболеваний серии «РеалБест».

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Набор «Лизирующий раствор» содержит комплект готовых для применения пробирок с расфасованным лизирующим раствором. Лизирующий раствор – это многокомпонентный раствор, содержащий внутренний контроль (ВКО). После того, как биологическая проба доставляется в лабораторию, часть ее переносится в пробирку с лизирующим раствором. Прогрев пробы при 98 °С в лизирующем растворе приводит к лизису клеток, выходу ДНК в раствор. После этого проба готова к постановке реакции ПЦР.

2.2. Состав набора:

- лизирующий раствор с ВКО – 200 пробирок (по 500 мкл);
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона (по 1,0 мл).

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Тест на отсутствие ингибирования – 100%.

3.2. Эффективность выделения (по ДНК *Mycoplasma hominis*) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение описанных 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. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как биологический материал человека может являться источником инфекционных заболеваний.

4.5. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР. Каждое помещение должно быть снабжено отдельным комплектом лабораторной одежды.

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

4.7. Выделение ДНК следует проводить в ламинарных боксах II класса защиты с включенным ламинарным потоком.

4.8. Для выделения ДНК необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром.

4.9. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке разных образцов биологического материала.

4.10. 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; 3% раствор хлорамина; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный бокс 2 класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с», фирма «Ламинарные системы», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf» с максимальной скоростью вращения не ниже 8000 об/мин (например, центрифуга «MiniSpin», фирма Eppendorf, Германия);
- встряхиватель для пробирок вихревой типа «Вортекс» (например, «Bio-Vortex V-1 plus», фирма BioSan, Латвия);
- термостат, позволяющий проводить выделение при температуре до 98 °С (например, «Thermo Shaker TS-100» с блоком SC20N, фирма BioSan, Латвия);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (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);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл (фирма Хеликон, Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка соскобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища, ротоглотки, конъюнктивы глаза и др.

Исследуемый материал, забранный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в пробирку с транспортным раствором (из набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» или «Транспортный раствор», производства ЗАО «Вектор-Бест»). Тщательно перемешать. Оставить зонд в пробирке, надломив в зоне насечки, либо извлечь зонд, предварительно отжав остатки жидкости о стенки пробирки (использованный зонд выбросить в контейнер с дезинфицирующим раствором), пробирку плотно закрыть. Проба готова к процедуре выделения (п. 7.1).

Транспортировать и хранить образцы:

- при температуре от 18 до 25 °С до 2 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель;
- при температуре минус (18-60) °С до 2 месяцев.

6.2. Подготовка образцов слюны и спермы.

При работе с образцами слюны или спермы внести 300 мкл образца в пробирку с транспортным раствором, тщательно перемешать на вортексе в течение 10 сек. Проба готова к процедуре выделения (п. 7.1).

Транспортировать и хранить образцы:

- при температуре от 18 до 25 °C до 2 суток;
- при температуре от 2 до 8 °C не более 2 недель;
- при температуре минус (18-60) °C до 2 месяцев.

6.3. Подготовка образцов мочи.

Для проведения ПЦР анализа используется первая порция утренней мочи, забранная в одноразовый пластиковый контейнер.

6.3.1. Отобрать необходимое количество пробирок с транспортным (из набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» или «Транспортный раствор», производства ЗАО «Вектор-Бест») и лизирующим раствором (по числу подготовленных имеющихся проб мочи). Промаркировать пробирки с транспортной средой, установить в штатив.

6.3.2. Мочу в контейнерах аккуратно перемешать.

6.3.3. Отобрать по 1,0 мл проб, перенести в соответствующие пробирки с транспортным раствором, используя наконечники с аэрозольным барьером.

6.3.4. Пробирки плотно закрыть крышками и тщательно перемешать содержимое на вортексе в течение 10 секунд.

6.3.5. Перенести пробирки в центрифугу и центрифугировать при 8000 об/мин при комнатной температуре в течение 5 минут.

6.3.6. Перенести пробирки в штатив, из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или вакуумным отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

6.3.7. В каждую пробирку с осадком клеток перенести полностью весь объём (500 мкл) раствора из соответствующей пробирки с лизирующим раствором.

6.3.8. Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд. Проба готова к термической обработке (п. 7.7).

Транспортировать и хранить образцы клеточного осадка мочи:

- при температуре от 18 до 25 °C не более 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C не более 1 суток;
- при температуре минус (18-60) °C не более 2 недель.

6.4. Подготовка компонентов набора.

Извлечь из набора для ПЦР серии «РеалБест» флакон с положительным контрольным

образцом (ПКО), соответствующий данному ПЦР-набору.

Внимание! Наборы для выявления ДНК возбудителей ИППП и герпесвирусных инфекций содержат универсальный ПКО.

7. ОБРАБОТКА КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБ (ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК)

Внимание! Для образцов мочи проводить выделение нуклеиновых кислот, начиная с п. 7.7.

7.1. Отобрать необходимое количество пробирок с лизирующим раствором (по числу подготовленных проб, включая ОКО и ПКО). Промаркировать пробирки, установить их в штатив.

7.2. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок с транспортным раствором, содержащим анализируемый материал.

7.3. В пробирки, содержащие лизирующий раствор, внести по 100 мкл пробы*, используя наконечники с аэрозольным барьером.

**Перед внесением пробы аккуратным пипетированием ресуспендировать осадок из клеток, полученный в пробирке с транспортной средой после центрифугирования, чтобы в выделение попала суспензия клеток.*

7.4. В пробирку положительного контроля выделения внести 100 мкл ПКО.

7.5. В пробирку отрицательного контроля выделения внести 100 мкл ОКО.

7.6. Пробирки плотно закрыть крышками и защёлкнуть замочек на крышках.

7.7. Поместить пробирки в предварительно прогретый до 98 °С термостат и прогреть при 98 °С в течение 15 минут.

7.8. После прогрева пробирки необходимо охладить до комнатной температуры (18-25 °С), перенести в центрифугу и центрифугировать при 8000 об/мин при комнатной температуре в течение 1 мин.

7.9. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

Внимание! Выделенную ДНК можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 24 часов.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 месяца.

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

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

8.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

8.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

9. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Лизирующий раствор» 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:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

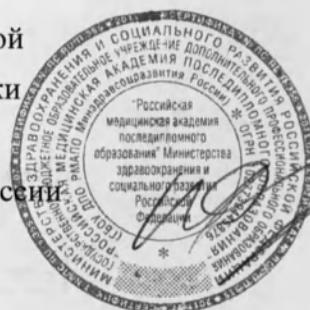
«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической

лабораторной диагностики

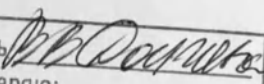
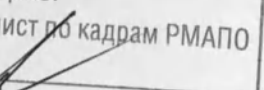
ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В.В. Долгов

«15» 03 2012г.

Подпись 
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись 
" " 20__ года

Handwritten signature



Промышленно, промывовано
и сжрплено печатко
Месмб Ансгов

