

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«» 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения ДНК из клинических образцов

«РеалБест ДНК-экспресс»

по ТУ 9398-412-23548172-2013

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (далее по тексту – набор) предназначен для транспортировки биопроб и выделения ДНК из соскобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища, ротоглотки, конъюнктивы глаза, 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 100 образцов, включая контрольные образцы.

1.4. Набор адаптирован только для применения с ПЦР-наборами серии «РеалБест» для выявления ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор «РеалБест ДНК-экспресс» содержит комплект готовых для применения пробирок с расфасованным транспортным раствором и пробирок с расфасованным лизирующим раствором.

Пробирки с транспортным раствором предназначены для забора и транспортировки биологических проб. Лизирующий раствор – это многокомпонентный раствор, содержащий внутренний контрольный образец (ВКО).

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

После того, как биологическая проба в транспортном растворе 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.

При планировании выделения ДНК следует предусмотреть, чтобы при каждом выделении наравне с биологическими пробами процедуру выделения проходили отрицательный контрольный образец и положительный контрольный образец (ПКО), который является компонентом наборов серии «РеалБест» для ПЦР-анализа.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- транспортный раствор – 100 пробирок (по 300 мкл);
- лизирующий раствор с ВКО – 100 пробирок (по 500 мкл);
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона (по 1,0 мл).

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Тест на отсутствие ингибирования по четырем отрицательным биопробам из СОП 05-2-440 – 100%. Набор соответствует техническим условиям по критерию отсутствия ингибирования, если во всех четырех биопробах (100%) определяется наличие ВКО (значение Ct ВКО по каналу FAM меньше или равно 40).

3.2. Эффективность выделения ДНК *Mycoplasma hominis* – 100%. Эффективность выделения ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по четырем образцам с концентрацией 100 копий в пробе, приготовленным из лиофилизированной смеси, содержащей ДНК *Mycoplasma hominis* из СОП 05-2-440, как процентное содержание образцов, определённых как положительные при ПЦР анализе.

3.3. Эффективность выделения ДНК, определенная на 95 положительных образцах соскобов эпителиальных клеток урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы глаза, а также образцов спермы, слюны и мочи - 100% (интервал 97%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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

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

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

4.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование 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»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ-287-113-00 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.11. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный бокс 2 класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с», фирма Ламинарные системы, Россия или аналогичный);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf» с максимальной скоростью вращения не менее 8000 об/мин («MiniSpin», фирма Eppendorf, Германия или аналогичная);
- встряхиватель для пробирок вихревой типа «Вортекс» («Bio-Vortex V-1 plus», фирма

BioSan, Латвия);

- термостат, обеспечивающий нагрев до 98 °С («Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N», фирма BioSan, Латвия или аналогичный);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками («Biohit», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые, нестерильные, неопудренные, латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма FinnTip, Финляндия);
- штатив для микропробирок вместимостью 1,5 мл (фирма Хеликон, Россия);
- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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. 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).

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).

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 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 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. При получении большого количества осадка промыть его, добавив 500 мкл транспортного раствора. Повторить процедуру перемешивания, центрифугирования и отбрасывания надосадочной жидкости (см. п. 6.3.4- 6.3.6).

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

6.3.9. Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд. Проба готова к процедуре выделения (п. 7.7).

6.3.10. Транспортировать и хранить образцы соскобов эпителиальных клеток, а также образцы слюны, спермы и мочи следует:

- 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 ПКО.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

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

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 отрицательный и положительный контроли). 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 положительного

контрольного образца (ПКО).

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

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

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

7.8. После прогрева пробирки необходимо охладить до температуры от 18 до 25 °С, перенести в центрифугу и центрифугировать при 8000 об/мин при температуре от 18 до 25 °С в течение 5 мин.

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

Внимание! Выделенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8°С не более 24 часов.

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

8.2. Набор реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности (12 мес).

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

Набор адаптирован только для применения с ПЦР-наборами серии «РеалБест»!

9. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

9.3. 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.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК-экспресс», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

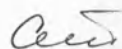
тел. (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс (383) 252-51-81, 252-51-77.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения

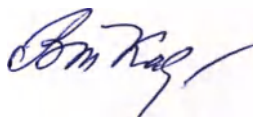
АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству

АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 7 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



Масяго А.В.
20 27 г.