ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения ДНК из клинических образцов

«РеалБест ДНК-экспресс (1)»

по ТУ 9398-412-23548172-2013

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «РеалБест ДНК-экспресс (1)» (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 применен 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 (1)» содержит комплект готовых для применения пробирок с лизирующим раствором. Лизирующий раствор – это многокомпонентный раствор, содержащий внутренний контрольный образец (ВКО).

Биологическая проба забирается и доставляется в лабораторию в пробирке с лизирующим раствором. Прогрев пробы при 98°С в лизирующем растворе приводит к лизису клеток и 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:

– лизирующий раствор с ВКО – 100 пробирок (по 1,5 мл);

– отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона (по 1,0 мл).

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 (по 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 обработке разных образцов биологического материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.9. 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»; 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);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf» с максимальной скоростью вращения не ниже 8000 об/мин (центрифуга «MiniSpin», фирма Eppendorf, Германия);

– 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 объёмом, 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 2 мл (фирма *(«Хеликон»*, Россия);

– контейнер с дезинфицирующим раствором *(«Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», «КМ-Проект», Россия)*.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка соскобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

уретры, влагалища, ротоглотки, конъюнктивы глаза и др.

Исследуемый материал, забранный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в пробирку с лизирующим 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. 7.1-7.7)*.

6.2. Подготовка образцов слюны и спермы.

При работе с образцами слюны или спермы внести 50 мкл образца в пробирку с лизирующим 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. Для проведения анализа потребуются пробирки с транспортным раствором (производство АО «Вектор-Бест»).

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 центрифугирования и отбирания надосадочной жидкости *(см. п. 6.3.5 и 6.3.6)*.

6.3.8. В каждую пробирку с осадком клеток перенести полностью весь объём *(1,5 мл*) раствора из соответствующей пробирки с лизирующим раствором.

6.3.9. Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд. Проба готова к процедуре выделения *(п. 7.1.-7.5)*.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– при температуре от 18 до 25 °С не более 2 часов;

– при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток;

– при температуре минус (18-60)°С 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 °С не менее 30 мин.

7.1. Отобрать 2 пробирки с лизирующим раствором. Промаркировать пробирки «ОКО» и «ПКО».

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

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

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

7.5. Поместить пробирки с исследуемыми образцами и контролями в предварительно прогретый до температуры 98°С термостат и прогреть при 98°С в течение 15 минут.

7.6. После прогрева пробирки необходимо охладить до комнатной температуры, перенести в центрифугу и центрифугировать при 8000 об/мин в течение 1 мин.

7.7. 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 (1)» 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 (1)», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru