УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 05.05.2012 № 2189-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«15» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов

для выделения РНК/ДНК из клинического материала

«МАГНО-сорб»

АмплиСенс®

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

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

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов предназначен для выделения (экстракции) РНК/ДНК из плазмы крови человека для последующего исследования на наличие вирусов гепатитов В и С, вируса иммунодефицита человека и других инфекций методом ПЦР (полимеразной цепной реакции).

ПРИНЦИП МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ.

Клинический образец обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц магнетизированной силики (магнитного сорбента). В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение нуклеиновых кислот (НК). Растворенная НК связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента на магнитном штативе и последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции НК к магнитному сорбенту происходит переход НК с поверхности носителя в раствор, который затем отделяется от частиц сорбента магнитной силой. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат НК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200.

Форма 2 включает комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000.

Форма 3 включает комплекты реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по комплектам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

СОСТАВ.

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 или вариант 100-1000 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Вариант 100-200*		*Вариант 100-1000*	
		Объем (мл)	*Кол-во*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость[1]	25	4 флакона	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость[1]	60	4 флакона	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	4 пробирки	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов вариант 100-200 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 200 мкл.

Комплект реагентов вариант 100-1000 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», подготовленными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008г.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

[1]При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 ºС возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК ИЗ ПРОБ.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема с возможностью дозирования от 1 до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
4. Штативы для пробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Axygen, США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axygen, США).
6. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм, с температурой от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия)

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

7. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с температурой от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия).
8. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл (например, Promega, США).
9. Магнитный штатив для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм (например, Promega, США).
10. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).
12. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные (например, Axygen, США).
13. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом 5 мл диаметром 12 мм (например, Axygen, США).
14. Электронный или механический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл (например, Axygen, США).
16. Холодильник от 2 до 8 °С.
17. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
18. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки проб).

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Экстракция из 1000 мкл образца плазмы.

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. При экстракции ДНК/РНК из 24 образцов:
   а) во флакон с **лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл)** внести необходимое количество содержимого из пробирки с **ВКО** (если он предусмотрен для анализа

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

данного возбудителя инфекции), все содержимое пробирки с **компонентом А (0,6 мл)** и все содержимое пробирки **с магнетизированной силикой (0,9 мл).**

б) закрыть крышку флакона и **аккуратно** перемешать переворачиванием 5-7 раз, избегая образования пены.

в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** подготовленной смеси **лизирующего раствора МАГНО-сорб, ВКО, компонента А и магнетизированной силики.**

4. <u>При экстракции ДНК/РНК менее чем из 24 образцов:</u>

   а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО** (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции), **компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО, 20 мкл Компонента А и 30 мкл Магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	**70**	**140**	**210**
12	**130**	**260**	**390**
18	**190**	**380**	**570**

   б) внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО, Компонента А и Магнетизированной силики.

   в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл лизирующего раствора МАГНО-сорб.**

5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1 мл исследуемого образца плазмы**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
6. В случае если это предусмотрено для анализа данного возбудителя, необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **1 мл** соответствующего **ПКО**. Если предусмотренный объем ПКО менее 1 мл, необходимо довести объем, используя ОКО. Перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **1 мл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин.**
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 1000 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
12. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая

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

отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.

13. Смыть магнетизированную силику со стенок осторожным вортексированием, а затем пипетированием, и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
14. Переставить пробирки в магнитный штатив и инкубировать **2 мин**.
15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Добавить **700 мкл раствора для отмывки 5**, ресуспендировать магнетизированную силику вортексированием, затем осадить капли кратким центрифугированием и повторить пп. 14-15.
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем коротко осадить капли на вортексе.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
21. Добавить **50 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе. Допускается увеличение объема элюции до 100 мкл.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив.

Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК/ДНК для внесения в ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

После отбора надосадочной жидкости в пробирки ДНК-пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С; РНК-пробы можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес при температуре не выше минус 16 °С или в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

Экстракция из 200 мкл образца плазмы.

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО** (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции), **компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО, 10 мкл Компонента А и 20 мкл Магнетизированной

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

силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	**70**	**70**	**140**
12	**130**	**130**	**260**
18	**190**	**190**	**380**
24	**250**	**250**	**500**

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО, компонента А и магнетизированной силики.
5. Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб.**
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **200 мкл исследуемого образца плазмы** и перемешать на вортексе.
7. В случае если это предусмотрено для анализа данного возбудителя, необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого пробирку с лизирующим раствором добавить **200 мкл** соответствующего **ПКО**. Если предусмотренный объем ПКО менее 200 мкл, необходимо довести объем, используя ОКО. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **200 мл ОКО**, перемешать на вортексе.
9. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
10. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин.**
11. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5.**
13. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.**
15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 12-15).
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6.**
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную

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

жидкость.

20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
21. Добавить **50 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе. Допускается увеличение объема элюции до 100 мкл.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК/ДНК для внесения в ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

РНК/ДНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 15 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 25 °С.

Рекламации на качество комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)[2].

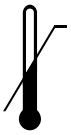
Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1» Е.Л. Никонов
Управления делами Президента Российской Федерации

[2] Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.

REF	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
LOT	Код партии		Максимальное число тестов
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

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