УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 27.05.2010г. №
4786-Пр/10

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____В.И.Покровский
«13» марта 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов

для экстракции ДНК экспресс-методом

«ЭДЭМ»

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ....3
НАЗНАЧЕНИЕ....3
ПРИНЦИП МЕТОДА....3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА....4
СОСТАВ....4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ....4
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ....5
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА....6
ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА....7
ПРОЦЕДУРА ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ....7
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ....9

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ТС	- транспортная среда
ВКО	- внутренний контрольный образец
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов для Экстракции ДНК Экспресс-Методом (ЭДЭМ) предназначен для обработки различных типов клинического материала: соскобного отделяемого и мазков со слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы глаз, эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи, а также из образцов первой порции мочи[1] человека с целью последующего исследования на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием комплектов реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Клинический материал, полученный от пациента, помещается в транспортную среду ТС-ЭДЭМ, в которой хранится и транспортируется в лабораторию. Для экстракции ДНК аликвота клинического образца переносится в пробирку с «ВКО-дилюентом», после чего подвергается термической обработке, в процессе которой происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. С помощью последующего центрифугирования нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а супернатант, содержащий ДНК, используется для проведения ПЦР. Находящийся в реактиве «ВКО-дилюент» внутренний контрольный образец (ВКО) проходит процедуру экстракции

[1] Для образцов мочи требуется предварительная обработка.

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

одновременно с ДНК, содержащейся в клиническом материале, и, таким образом, является маркером качества лабораторного исследования клинического образца.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА

Комплект реагентов выпускается в 1 форме комплектации:
Форма 1 комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ».

СОСТАВ

Комплект реагентов «ЭДЭМ» – комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
Транспортная среда ТС-ЭДЭМ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок
ВКО-Дилюент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	100 пробирок

К комплекту прилагается реагент:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ПЦР-буфер-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов мазков и соскобного отделяемого, включая контроли. Для экстракции ДНК из образцов мочи необходимо использовать дополнительный реагент – транспортную среду «ТС-ЭДЭМ» (50 мл).

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», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» 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».
При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

- 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».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- 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

1. Бокс биологической безопасности (бокс абактериальной воздушной среды) 2 класса защиты.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16000 об/мин.
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 1,5 и 2,0 мл.
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки

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

по МУ 1.3.1888-04.

10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Процедура взятия клинического материала проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ВНИМАНИЕ! Взятие клинического материала (кроме мочи[2]) производится только в пробирки с транспортной средой ТС-ЭДЭМ, входящей в состав набора реагентов «ЭДЭМ».

Получение соскобного отделяемого и мазков со слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы глаз, эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи.

1. Открыть пробирки с **ТС-ЭДЭМ**, предварительно стряхнув капли жидкости со стенок и внутренней части крышки на дно пробирки.
2. Погрузить рабочую часть зонда с клиническим материалом в транспортную среду **ТС-ЭДЭМ** и, отломив её в области насечки (если имеется), оставить в пробирке. В случае отсутствия насечки, погрузить рабочую часть зонда в среду, и прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 с, после чего зонд удалить. Пробирку плотно закрыть.

Клинический материал, помещенный в транспортную среду ТС-ЭДЭМ в плотно закрытой пробирке можно транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от +18 до +25 °С) не более 48 ч;
- при температуре от +2 до +8 °С не более 14 сут;
- для более длительного хранения образцы заморозить при температуре минус 20 °С и ниже.

Получение первой порции мочи

Получают первую порцию утренней мочи в количестве 15-25 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50 мл.

Образцы мочи можно транспортировать и хранить:

[2] Для образцов первой порции мочи требуется предварительная обработка

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

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА (требуется только для мочи)

1. Взболтать флакон с мочой.
2. В пробирку с транспортной средой ТС-ЭДЭМ (0,5 мл) внести **1 мл** мочи, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
3. Центрифугировать пробирки, содержащие ТС-ЭДЭМ и мочу, при **12 тыс об/мин** в течение **5 мин** для получения осадка.
4. Не затрагивая осадок, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
5. Добавить в каждую пробирку с осадком мочи **0,5 мл ТС-ЭДЭМ**, используя для каждой пробы отдельный наконечник. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе, чтобы ресуспендировать осадок, и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки кратким центрифугированием при 1,5-3 тыс об/мин в течение 2-3 с.
6. Полученные образцы осадка мочи в транспортной среде ТС-ЭДЭМ использовать для проведения процедуры экстракции ДНК, как описано выше.

Полученные образцы осадка мочи в транспортной среде ТС-ЭДЭМ можно хранить:

- при комнатной температуре (от +18 до +25 °С) не более 48 ч;
- при температуре от + 2 до +8°С не более 14 сут;
- для более длительного хранения образцы заморозить при температуре минус 20 °С и ниже.

ПРОЦЕДУРА ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

1. Включить термостат и установить температуру 95 °С.
2. Подготовить и расставить в штативе необходимое количество пробирок с реактивом **ВКО-Дилюент** и промаркировать их. Осадить капли раствора со стенок

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

пробирки и внутренней части крышки кратким центрифугированием при 1,5-3 тыс об/мин в течение 2-3 с.

3. Перед проведением процедуры экстракции ДНК перемешать на вортексе содержимое пробирок с клиническим материалом в транспортной среде ТС-ЭДЭМ и осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием при 1,5-3 тыс об/мин в течение 2-3 с. Расставить подготовленные пробирки в штативе.
4. Перенести по **100 мкл** клинического материала в транспортной среде ТС-ЭДЭМ в подготовленные пробирки с **ВКО-Дилюентом**, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля выделения («В-») внести **100 мкл** транспортной среды **ТС-ЭДЭМ**.
5. Пробирки плотно закрыть, аккуратно, не разбрызгивая, перемешать содержимое на вортексе, и поместить в термостат на **5 мин** при **95 °С.**

ВНИМАНИЕ! Если пробирки неплотно закрыты, то может произойти открывание пробирок во время прогревания.

6. После окончания инкубации поместить пробирки в настольную центрифугу и центрифугировать при **14 тыс об/мин в течение 1 мин.** Полученные таким образом пробы ДНК готовы к проведению последующей ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Пробы ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С (при повторном ПЦР-исследовании проб ДНК, содержимое пробирок необходимо перемешать на вортексе и повторить центрифугирование в соответствии с п.6).

ВНИМАНИЕ! При проведении ПЦР-исследования полученных проб ДНК с помощью комплектов реагентов вариант FEP для приготовления пробирки «Фон» следует использовать реагент ПЦР-буфер-Фон, прилагаемый к комплекту реагентов «ЭДЭМ». Пробирку «Фон» подготавливают следующим образом: в пробирку с ПЦР-смесью-1 на прослойку воска внести 10 мкл реагента ПЦР-буфера-Фон, затем внести 10 мкл пробы отрицательного контроля выделения («В-»), обработанной в соответствии с данной инструкцией.

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

ВНИМАНИЕ! В случае получения невалидного или сомнительного результата ПЦР-исследования с использованием комплекта реагентов «ЭДЭМ» необходимо повторно провести процедуру экстракции ДНК. Для этого 100 мкл клинического материала в транспортной среде ТС-ЭДЭМ следует обработать с помощью комплекта «ДНК-сорб-АМ» согласно инструкции к этому набору.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 25 °С не более 7 сут.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. Транспортную среду ТС-ЭДЭМ можно хранить не более 14 сут при температуре до 25 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество комплекта реагентов **«ЭДЭМ»** направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Отзывы и предложения о продукции **«АмплиСенс®»** можно оставить, заполнив анкету потребителя на сайте www.amplisens.ru.

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

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

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