

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека



В.В. Малеев

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для выделения ДНК из клинического материала

«ДНК-сорб-АМ»

В настоящей инструкции применяются следующие термины и сокращения:

ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
ИППП	– Инфекции, передающиеся половым путем
ВКО комплексный	– Внутренний контрольный образец для проведения ПЦР с электрофоретической детекцией
ВКО-FL	– Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
ПКО	– Положительный контрольный образец
ОКО	– Отрицательный контрольный образец
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов предназначен для выделения (экстракции) ДНК из соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаз, эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи, а также из образцов мочи человека для последующего исследования на возбудители ИППП и других инфекций органов репродукции методами ПЦР с использованием соответствующих комплектов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ.

Клинический образец, (клинический материал, помещенный в транспортную среду) обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц силики - сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный

препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

СОСТАВ И ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает **вариант 50** – комплект реагентов для выделения ДНК из 50 проб, включая контроли;

Форма 2 включает **вариант 100** – комплект реагентов для выделения ДНК из 100 проб, включая контроли;

Форма 3 включает **вариант 50** – комплект реагентов для выделения ДНК из 50 проб, не включая контроли;

Форма 4 включает **вариант 100** – комплект реагентов для выделения ДНК из 100 проб, не включая контроли.

СОСТАВ.

Реактив	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем (мл)	Кол-во	Объем (мл)	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	1 пробирка	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка	5,0	2 пробирки

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются следующие реагенты:

Реактив	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем (мл)	Кол-во	Объем (мл)	Кол-во
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка	1,2	1 пробирка

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ.

Процедура взятия клинического материала описана в методических рекомендациях «Взятие, транспортировка,

Форма 2: **REF** K1-11-100, **REF** K5-0362-100; Форма 4: **REF** K1-12-100, **REF** K5-0364-100 /

VER 30.03.17 / стр. 3 из 11

хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», подготовленными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Материалом для исследования служат: соскобный материал и отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаз, эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи, а также образцы мочи человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- 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, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне

Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром². Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Комплект реагентов предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Комплект реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять Комплект реагентов строго по назначению.
- К работе с комплектом реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать комплект реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать комплект реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

² Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Не использовать комплект реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК.

1. Стерильный ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой

- для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
 5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
 6. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
 7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
 8. Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
 9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
 10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
 11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
 13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
 14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ПРОЦЕДУРА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ.

Забор клинического материала должен производиться в пробирки с транспортной средой, рекомендованной ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Подготовка к проведению процедуры выделения ДНК.

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) следует прогреть, перемешивая при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
3. Подготовить и расставить в штативе необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых

- пробирок объемом 1,5 мл и промаркировать их.
4. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническими образцами. Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1500-3000 об/мин в течение 5 с), после чего аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Процедура выделения ДНК.

1. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внести по **10 мкл** ВКО-комплексного или ВКО-FL в зависимости от метода детекции продуктов ПЦР (см. СОСТАВ И ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ). При использовании наборов реагентов с разными методами детекции допускается внесение двух препаратов внутреннего контрольного образца по 10 мкл каждого.
2. Ресуспендировать сорбент и внести в каждую пробирку по **20 мкл сорбента универсального**, после чего внести по **300 мкл лизирующего раствора**, используя наконечники с аэрозольным барьером.

Примечание – Если количество обрабатываемых клинических образцов составляет более 50 за рабочую смену, рекомендуется добавить весь объем сорбента и ВКО во флакон с лизирующим раствором (2 мл сорбента универсального и 1 мл ВКО на 30 мл лизирующего раствора). Полученную суспензию тщательно перемешать и внести по 330 мкл в подготовленные пробирки. Допускается хранение смеси не более 2 сут при комнатной температуре. Перед применением суспензию тщательно перемешать.

3. Внести по **100 мкл** клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля выделения внести **100 мкл ОКО**.
4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать **5 мин при 65 °С** в термостате. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной

- температуре на **2 мин.**
5. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при **10 тыс об/мин в течение 30 сек.** Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
 6. Добавить в пробы по **1 мл отмывочного раствора**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
 7. Повторить п. 5.
 8. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С** на **5-10 мин** для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
 9. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера** для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 65 °С на 5 мин. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 150 мкл.
 10. Центрифугировать пробирки при **12 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Полученные 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. При повторном исследовании проб, содержаемое пробирок необходимо перемешать на вортексе и повторить п.10.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

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

Транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ВКО комплексного, ВКО-FL и ОКО. ВКО комплексный, ВКО-FL и ОКО хранить при температуре от 2 до 8 °С.

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

Рекламации на качество комплекта реагентов **«ДНК-сорб-АМ»** направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru³.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

LOT

Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

IVD

Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель