«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для автоматического
выделения нуклеиновых кислот
из клинических образцов
«РеалБест УниМаг»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест УниМаг» предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из клинических образцов: сыворотки (плазмы) крови, лейкоцитарной фракции крови, биоптатов, ликвора, мочи, фекалий, соскобов эпителиальных клеток, а также из материалов объектов окружающей среды: суспензий клещей, проб воды.

Набор предназначен для автоматического выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов с использованием прибора «KingFisher Flex» производства «Thermo Fisher Scientific» (Финляндия). Допускается адаптация других станций автоматического выделения нуклеиновых кислот открытого типа для работы с набором.

Набор предназначен для применения с наборами для выявления нуклеиновых кислот серии «РеалБест».

Набор рассчитан на выделение нуклеиновых кислот из 96 образцов, включая контрольные образцы. Обеспечивает возможность проведения до 4 независимых процедур выделения по 24 образца в каждой, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип действия набора «РеалБест УниМаг» состоит в температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплексы нуклеиновых кислот с белками, с последующей сорбцией на магнитные частицы, покрытые силикагелем, спиртовой отмывкой и элюцией. После этого проба готова к постановке реакции ПЦР/ОТ-ПЦР.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО) и проведении реак-

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

ции амплификации выбранного фрагмента НК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Положительный контрольный образец (ПКО) входит в состав ПЦР-наборов серии «РеалБест». ПКО проходит процедуру выделения наравне с биологическими пробами и отрицательным контрольным образцом (ОКО).

2.2. Состав набора:

– лизирующий раствор – 4 флакона по 15 мл;

– раствор для отмывки № 1 – 4 флакона по 15 мл;

– раствор для отмывки № 2 – 4 флакона по 15 мл;

– элюирующий раствор – 4 флакона по 10 мл;

– сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 флакон, 1 мл;

– раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 флакона по 4 мл;

– отрицательный контрольный образец (ОКО) – 4 флакона по 3 мл;

– внутренний контрольный образец (ВКО), лиофилизированный – 4 флакона.

Принадлежности:

– завинчивающиеся пластиковые крышки для флаконов ВКО – 4 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Тест на эффективность выделения РНК ВГА определяется по восьми образцам с содержанием РНК ВГА 50 копий в пробе, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП РНК ВГА (рег. № 05-2-504), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные.

3.2. Эффективность выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), определенная на 119 образцах – 100% (интервал 97,5%-100%);

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

<u>Внимание!</u> Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (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/РНК и постановки ПЦР/ОТ-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.

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

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

4.8. 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»)*.

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

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– станция автоматического выделения KingFisher Flex («Thermo Fisher Scientific», Финляндия);

– планшеты глубоколуночные на 2 мл («Thermo Fisher Scientific», Финляндия);

– насадка на магнитную головку («Thermo Fisher Scientific», Финляндия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

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

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером-(например, фирма «FinnTip», Финляндия);

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

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка образцов сыворотки (плазмы) крови

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать сыворотку (плазму) в отдельную пробирку.

Транспортировать и хранить образцы при температуре (18-25) °С до 2 часов; при температуре (2-8) °С не более суток; при температуре минус (18-60) °С до 1 месяца. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Образцы сыворотки или плазмы крови перед использованием необходимо центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 минут при температуре *(18-25) °С*. Для проведения анализа требуется 100 мкл сыворотки крови или плазмы крови (полученной с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта).

6.2. Получение лейкоцитарной фракции крови

Клетки крови (лейкоцитарную фракцию цельной крови, лейкоцитарную пленку) следует отбирать после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Используя наконечник с фильтром аккуратно собрать лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

Транспортировать и хранить образцы при температуре (2-8) °С не более суток; при температуре минус (18-60) °С до 1 месяца. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.3. Подготовка образцов ликвора

Образцы ликвора готовы к анализу.

Транспортировать и хранить образцы при температуре (18-25) °С до 2 часов; при температуре (2-8) °С не более суток; при температуре минус минус (18-60) °С до 2 недель.

6.4. Подготовка образцов мочи

Первую порцию утренней мочи собрать в чистый флакон с плотной крышкой. 1,5-2,0 мл мочи отобрать в пробирку, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 3 минут. Супернатант удалить практически полностью, не задевая осадок. Полученный образец использовать для выделения нуклеиновых кислот.

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

Транспортировать и хранить образцы при температуре (18-25) °С до 2 часов; при температуре (2-8) °С в течение 1 суток; при температуре минус (18-60) °С в течение 2 недель.

6.5. Подготовка образцов биоптатов и фекалий.

Подготовку образцов биоптатов и фекалий проводить согласно процедуре, описанной в Методических указаниях "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности" (МУ 1.3.2569-09).

6.6. Подготовка образцов соскобов эпителиальных клеток.

Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок, содержащих соскобы эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища.

Транспортировать и хранить образцы при температуре (18-25) °С до 2 суток; при температуре (2-8) °С не более 2 недель; при температуре минус (18-60) °С до 2 месяцев. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.7. Подготовка суспензий клещей.

Исследуемых клещей поместить в пронумерованные пробирки типа *Eppendorf* объёмом 1,5 мл (при использовании автоматических гомогенизаторов – в пробирки, рекомендованные производителем).

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей (масло, бензин и т.п.), перед приготовлением суспензии следует провести их промывку (см. пункт а). В случае, если клещ не загрязнён, можно сразу приступить к приготовлению суспензии (см. пункт б).

а) Предварительная промывка клещей: Добавить в каждую пробирку с клещом **300 мкл 96% этанола**, встряхнуть пробирки на шейкере, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и удалить спирт с помощью вакуумного отсасывателя, не касаясь клеща, используя отдельные наконечники для каждой пробы. Далее внести в пробирки по **500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия**, встряхнуть пробирки на шейкере и сбросить капли со стенок пробирок коротким центрифугированием; удалить жидкость из пробирок с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя, используя отдельные наконечники для каждой пробы.

б) Приготовление суспензии клещей:

Метод 1: Добавить в пробирки с клещами по 250 мкл охлаждённого раствора для подготовки образцов (РПО). Пробирки поместить в гомогенизатор и провести процедуру измельчения

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

клещей.

Метод 2: В пробирки с клещами внести по 30 мкл раствора РПО *(в случае анализа напитавшихся клещей, клещей больших размеров внести по 50 мкл РПО)*. Поместить пробирки в охлаждённый до минус (20-30) °С штатив-холодильник или в жидкий азот и заморозить. Достать одну замороженную пробирку с клещом и максимально быстро, не дожидаясь оттаивания раствора, тщательно измельчить клеща с помощью отдельного стерильного пестика. Не вынимая пестик, поставить пробирку с измельчённым клещом в штатив, помещённый в лёд. Добавить в пробирку 200 мкл охлаждённого РПО. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в дезинфицирующий раствор.

Перемешать содержимое пробирки на вортексе *(5-10 секунд).* Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Коротким центрифугированием сбросить содержимое со стенок на дно пробирки.

Транспортировать и хранить образцы при температуре (2-8) °С в течение 1 суток; при температуре минус (18-60) °С в течение 2 недель.

6.8. Подготовка проб воды.

Образцы концентратов (элюатов) водных проб получают согласно Методическим указаниям «Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор и профилактика вирусного гепатита А» (МУ 3.1.2837-11).

6.9. Подготовка компонентов набора.

6.9.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 минут .

6.9.2. Извлечь из набора для ПЦР серии «РеалБест» флаконы (пробирки) с контрольными образцами (ПКО, КО1, КО2), соответствующими данному ПЦР набору, и подготовить их к работе согласно инструкции к набору для ПЦР.

6.9.3. Лизирующий раствор и раствор для отмывки № 1 перед началом работы прогреть при температуре (50-60) °С до растворения осадка.

6.9.4. Вскрыть флакон с ВКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышку и пробку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18-25) °С 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

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

7. ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБ

7.1. Добавить во флакон с лизирующим раствором 750 мкл ВКО. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом и добавить во флакон с лизирующим раствором 150 мкл суспензии сорбента, перемешать.

7.2. Промаркировать 5 глубоколуночных планшетов: ЛР, РО1, РО2, ЭР, ГР – по 1 планшету.

7.3. Составить схему размещения контрольных и исследуемых образцов в глубоколуночном планшете на трафарете (рисунок 1). Количество контрольных образцов указано в инструкции к набору для ПЦР.

Рисунок 1. Трафарет размещения контрольных и исследуемых образцов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

7.5. В глубоколуночный планшет ГР поместить насадку на магнитную головку.

7.6. Перемешать флакон с раствором для отмывки №1. В лунки глубоколуночного планшета РО1 добавить по 500 мкл раствора для отмывки №1 согласно схеме размещения образцов.

7.7. В лунки глубоколуночного планшета РО2 добавить по 500 мкл раствора для отмывки №2 согласно схеме размещения образцов.

7.8. В лунки глубоколуночного планшета ЭР добавить по 200 мкл элюирующего раствора согласно схеме размещения образцов.

7.9. Перемешать флакон с лизирующим раствором с ВКО и сорбентом. В лунки глубоколуночного планшета ЛР добавить по 500 мкл лизирующего раствора с ВКО и сорбентом согласно схеме размещения образцов.

7.10. В лунки глубоколуночного планшета ЛР внести 30 мкл контрольного образца (ПКО, КО1, КО2) и 70 мкл ОКО согласно схеме размещения образцов.

7.11. В лунки глубоколуночного планшета ЛР внести 100 мкл ОКО согласно схеме размещения образцов.

7.12. В лунки глубоколуночного планшета ЛР внести по 100 мкл исследуемых проб

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

согласно схеме размещения образцов.

7.13. Включить станцию автоматического выделения KingFisher Flex и персональный компьютер, управляющий станцией.

7.14. Запустить на персональном компьютере программное обеспечение “BindIt for KingFisher" и выбрать протокол выделения нуклеиновых кислот «РеалБест УниМаг».

7.15. По запросу программного обеспечения станции автоматического выделения KingFisher Flex установить глубоколуночные планшеты в прибор: ГР, ЛР, РО1, РО2, ЭР. После установки планшета ЭР запустится процесс выделения НК.

7.16. По окончанию автоматического выделения НК, прибор подаст звуковой сигнал.

7.17. Вынуть из прибора глубоколуночный планшет ЭР.

7.18. Пробы в глубоколуночном планшете ЭР готовы к постановке ПЦР (ОТ-ПЦР)-анализа.

7.19. *Внимание! Выделенная НК хранению не подлежит. Готовить в день проведения ПЦР (ОТ-ПЦР).*

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

8.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

8.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

9. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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, возник-

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

ших 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.

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

630559, Новосибирская обл., 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