«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«28» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов
«РеалБест экстракция 100»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест экстракция 100» предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из клинических образцов: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, лейкоцитарной фракции крови, биоптатов, ликвора, мочи, фекалий, соскобов эпителиальных клеток и др., а также из материалов объектов окружающей среды: суспензий клещей, проб воды и др.

Набор реагентов «РеалБест экстракция 100» может быть применен в клинической практике.

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

Набор рассчитан на выделение нуклеиновых кислот из 48 образцов, включая контрольные образцы. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип действия набора «РеалБест экстракция 100» состоит в температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплекс нуклеиновых кислот с белками, с последующим спиртовым осаждением нуклеиновых кислот на магнитные частицы, спиртовыми отмывками и последующей элюцией. После этого проба готова к постановке реакции ПЦР или ОТ-ПЦР.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом и проведении реакции обратной транскрипции и амплификации выбранного фрагмента РНК или амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Для удобства пользователя при работе с набором рекомендуется применение магнитного штатива. Возможно выделение нуклеиновых кислот из 100 и 200 мкл пробы.

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

В состав ПЦР наборов серии «РеалБест» входит положительный контрольный образец, соответствующий данному ПЦР набору. ПКО должен проходить процедуру выделения наравне с исследуемыми пробами и отрицательным контрольным образцом.

2.2. Состав набора:

Комплект реагентов для выделения НК

- лизирующий раствор – 8 фл. по 4,0 мл;
- осадитель НК – 4 фл. по 12,0 мл;
- раствор для отмывки № 1 – 4 фл. по 8,0 мл;
- раствор для отмывки № 2 – 4 фл. по 5,0 мл;
- элюирующий раствор – 12 фл. по 3,0 мл;
- сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 фл., 1,0 мл.

Комплект контрольных образцов

- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 фл. по 4,0 мл;
- отрицательный контрольный образец (ОКО)– 2 фл. по 2,0 мл;
- внутренний контрольный образец (ВКО), лиофилизированный – 2 фл;

Набор дополнительно комплектуется пластиковыми крышками для флаконов с контрольными образцами – 2 шт.

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Эффективность выделения (по РНК ВГС) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (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 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. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ОТ-ПЦР в режиме

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

реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

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. 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

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия или аналогичные);

– одноразовые наконечники для пипеток (фирма FinnTip, Финляндия);

– одноразовые полипропиленовые пробирки на 2,0 мл (фирма SSI, США, кат. № 2340 или аналогичные);

– магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (ЗАО «Вектор-Бест», кат.№ Е9291, Россия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);

– штатив для пробирок на 2,0 мл (фирма SSI, США или аналогичный);

– термошейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 600 - 1300 об/мин и температуре 60-90 °С («Thermo Shaker TS-100» [с блоком для пробирок объемом 2,0 мл], фирма BioSan, Латвия или аналогичный);

– встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» («Bio-Vortex V-1 plus», фирма BioSan, Латвия или аналогичный);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия

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

или аналогичные);

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

– отсасыватель медицинский В-40 (фирма ВИСМА-ПЛАНАР, Россия или аналогичный);

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

– ламинарный бокс 2 класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с», фирма Ламинарные системы, Россия или аналогичный).

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия).

– холодильник бытовой.

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка образцов цельной крови

Внимание. ***Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной крови.***

Кровь забирается в вакуумную пробирку с ЭДТА или с цитратом натрия. После забора крови ее необходимо плавными движениями перемешать с антикоагулянтом, находящимся в пробирке.

Транспортировать и хранить образцы при температуре (18-25) °С до 2 ч; при температуре (2-8) °С не более 48 ч.

6.2. Подготовка образцов сыворотки (плазмы) крови

Внимание. ***Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.***

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 ч; 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 мин при температуре *(18-25) °С*.

6.3. 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

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

температуре минус (18-60) °С до 1 месяца. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.4. Подготовка биоптатов и ликвора

Биоптаты и ликвор готовы к анализу.

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

6.5. 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 мин. Супернатант удалить практически полностью, не задевая осадок. Полученный образец использовать для выделения нуклеиновых кислот.

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

6.6. Подготовка образцов фекалий.

Подготовку образцов 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).

6.7. 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.

6.8. 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**

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

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 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.

6.9. 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).

6.10. Подготовка компонентов набора.

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

6.10.2. Извлечь из набора для ПЦР серии «РеалБест» флакон (пробирку) с ПКО, соответствующий данному ПЦР набору.

6.10.3. Вскрыть флакон с ВКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышку и пробку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1,0 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать.

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

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

6.10.4. Лизирующий раствор перед началом работы прогреть при температуре (50-60) °С до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

Внимание! Лизирующий раствор после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.

7. ОБРАБОТКА ПРОБ (ВЫДЕЛЕНИЕ НК)

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).

7.2. В каждую пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО.

7.3. Для отрицательного контроля в пробирку, маркированную «ОКО», внести 100 мкл ОКО.

7.4. Для положительного контроля в пробирку (пробирки), маркированные «ПКО», внести 80 мкл ОКО и 20 мкл ПКО.

7.5. В остальные пробирки внести по 100 мкл исследуемых образцов. Для увеличения чувствительности можно использовать 200 мкл исследуемого образца. (При выделении НК из цельной крови выделение проводится из 50 мкл пробы).

7.6. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 300 мл лизирующего раствора с сорбентом.

Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере при 65°С с частотой вращения 1300 об/мин в течение 10 мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

В случае, если образец лизировался не полностью, перенести содержимое в чистую пробирку, стараясь не захватить осадок.

7.7. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 400 мкл осадителя НК.

7.8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин при температуре (18-25) °С.

7.9. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.10. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 с. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 мин на микроцентрифуге.

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

7.11. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.12. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 мин на микроцентрифуге.

7.13. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.14. Высушить осадки в открытых пробирках в течение 2-3 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.15. В каждую пробирку к осадку добавить элюирующий раствор.

Если из выделенной биопробы будет производиться от 1 до 3 определений возбудителей инфекций следует добавить 200 мкл элюирующего раствора. Если определений будет производиться больше – добавить 600 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере в течение 5 мин при 65 °С с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 1 мин. Пробы готовы к постановке ПЦР или ОТ-ПЦР-анализа.

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

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 суток.

8.2. Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

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

9. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест экстракция 100»**, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36,

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

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