«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выделения нуклеиновых кислот из образцов сыворотки (плазмы) крови
«РеалБест экстракция 1000»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест экстракция 1000» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из сыворотки (плазмы) крови.

Набор может быть применен в клинической практике при диагностике различных инфекционных заболеваний человека, а также для высокочувствительного скринирования донорской крови и определения инфекционной нагрузки и оценки эффективности терапии методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР).

Набор предназначен для применения с наборами для определения нуклеиновых кислот (ДНК либо РНК) возбудителей инфекций 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 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 метода 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.

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

Применённый в наборе метод дополнительного концентрирования нуклеотидного материала позволяет повысить чувствительность детекции.

Для удобства пользователя при работе с набором рекомендуется применение магнитного штатива. Возможно выделение нуклеиновых кислот из 1,0 и 0.5 мл сыворотки (плазмы) крови.

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

2.2. Состав набора:

Комплект реагентов для выделения НК

- концентрирующий раствор – 4 фл. по 14,0 мл;
- лизирующий раствор № 1 – 4 фл. по 4,0 мл;
- лизирующий раствор № 2 – 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 – 4 фл. по 3,0 мл;
- сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 фл., 1,0 мл;

Комплект контрольных образцов

- отрицательный контрольный образец (ОКО) на основе инактивированной сыворотки крови человека – 3 фл. по 12,0 мл;
- внутренний контрольный образец (ВКО), лиофилизированный – 2 фл.;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 фл. по 4,0 мл.

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения НК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при иссле-

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

довании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов или другие возбудители вирусных инфекций.

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

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. Выделение НК следует проводить в ламинарных боксах II класса защиты с включенным ламинарным потоком.

4.7. Для выделения НК необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром.

4.8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке разных образцов биологического материала.

4.9. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 3% раствор хлорамина; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

– одноразовые наконечники для пипеток (фирма FinTip, 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 или аналогичный);

– 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

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

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 или фиксированным объёмом, со сменными наконечниками, (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия 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).

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка образцов сыворотки (плазмы) крови

Для проведения анализа требуется 1,0 мл (допускается выделение из 0,5 мл) сыворотки (плазмы) крови.

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать сыворотку (плазму) в отдельную пробирку. Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °С до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °С не более суток; при температуре минус 20 °□С до 2 недель.

Образцы сывороток или плазмы крови перед использованием необходимо центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

<u>Внимание.</u> Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.

6.2. Подготовка компонентов набора:

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при температуре от 18 до 25 °С в течение 30 мин.

6.2.2. Извлечь из набора для ПЦР серии «РеалБест» флакон с ПКО, соответствующий данному ПЦР набору.

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

6.2.3. Во флакон с внутренним контрольным образцом (ВКО) добавить 1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать. После разведения хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

6.2.4. Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к применению. После вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

6.2.5. Лизирующие растворы перед началом работы прогреть при температуре от 50 до 60 °С до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной дисперсии и во флакон с лизирующим раствором № 2 добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

Внимание! Лизирующий раствор № 2, после вскрытия и добавления суспензии сорбента, хранению не подлежит.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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 1,0 мл ОКО.

7.4. Для положительного контроля в пробирку (пробирки), маркированную «ПКО», внести 970 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.

7.5. В остальные пробирки внести по 1,0 мл исследуемых образцов.

Если объём исследуемого образца меньше 1,0 мл, допускается выделение НК из 0,5 мл сыворотки (плазмы) крови.

7.6. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 1,0 мл концентрирующего раствора.

Если объём исследуемого образца 0,5 мл, внести в пробирку 0,5 мл концентрирующего раствора.

7.7. Пробирки закрыть крышками, содержимое пробирок тщательно перемешать переворачиванием 5 раз и выдержать в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.8. Из каждой пробирки пипеткой или отсасывателем с отдельным наконечником максимально полно удалить надосадочную жидкость.

7.9. В каждую пробирку к полученному осадку добавить по 200 мкл лизирующего раствора № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек, чтобы

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

осадок отслоился от дна пробирки. Выдержать 5 мин при температуре от 18 до 25 °С. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирки.

7.10. В каждую пробирку с лизирующим раствором № 1 добавить по 500 мкл лизирующего раствора № 2 с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере в течение 10 мин при 56°С с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.11. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 750 мкл осадителя НК.

7.12. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Оставить на 3-5 мин при температуре от 18 до 25 °С. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин.

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

7.14. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге.

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

7.16. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге.

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

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

7.1 9. В каждую пробирку к осадку добавить по 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе. Инкубировать в термошейкере в течение 10 мин при 56°С с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать на микроцентрифуге 1 мин при 13000 об/мин. Пробы готовы к постановке ПЦР или ОТ-ПЦР-анализа.

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

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

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

8.2. Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

8.3. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

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, следует обращаться в **ЗАО «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